T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPİR ISLAHINDA KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERDEN YARARLANILARAK OLEİK ASİT ORANININ KALITIMININ BELİRLENMESİ

MERVE GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DOÇ. DR. YALÇIN KAYA

EDİRNE-2016

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Doç.Dr. Yalçın KAYA
Ana Bilim Dalı Başkan V.

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Yalçın KAYA
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Doç.Dr. Yalçın KAYA	
Doç.Dr. Semra HASANÇEBİ	
Yrd.Doç.Dr. Orhan Onur AŞKIN	

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

10 Ağustos 2016
Merve GÜZEL

Yüksek Lisans Tezi
Merve GÜZEL
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), Compositae (Asteraceae) familyasına ait tek yıllık bir yağ bitkisi olup kuraklığa dayanıklılığı ile dikkat çekmektedir. Sap, yaprak, tohum ve çiçekleri farklı amaçlarla kullanılan önemli bir endüstri bitkisidir. Dünyada oleik tipteki yağlar kızartmaya uygunluğu ile ön plana çıkarak tüketiciler tarafından tercih edilmektedir.Aspirde oleik asit önemli bir karakter olmasına rağmen ülkemizde sadece hasat sonrasında taneden belirlenmekte, bu durum da ıslah çalışmalarının bir yıl sonra yürütülmesine ve gecikmesine neden olmaktadır. Yüksek oleik asit özelliği yapılacak seleksiyonda bitkiler çiçeklenmeden ve döllenme gerçekleşmeden belirlenemediğinden bu durum ıslah çalışmalarını yavaşlatma ve maliyetleri arttırmaktadır.Çeşit geliştirmeçalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerden yararlananılarak özellikle de marköre dayalı seleksiyon kullanılarak daha hızlı ve güvenli bir sonuca ulaşılabilmektedir. Bu çalışmada; yüksek ve düşük oleik yağ asidi içeren aspir genotiplerini birbirinden ayırt edebilecek moleküler markör belirlenmesine çalışılmıştır. Çalışmada yüksek ve düşük oleik yağ asidi içeren iki aspir hattı melezlenmiş veF_2 jenerasyonunda işaretlenen bitkilerin yaprak dokularından DNA izolasyonu yapılmıştır. Literatürde, aspirde yağ içeriğini kontrol eden *FAD2* ve *Ol* genleri ile bağlantılı olarak haritalanmış SCAR markörleri seçilerek bu markörlerle tarama yapılmıştır. Seçilen ebeveyn çeşitler ve F_2 bitkilerinin yağ içeriği ile moleküler markörlerden elde edilen bant profilleri eşleştirilerek değerlendirilmiş ve ıslahta seleksiyon amaçlı kullanılabilecek bir markör belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda IASCA 73 SCAR markörü, bireyler arasında seçicilik gösteren kodominant özellikte bir markör olarak belirlenmiş ancak yağ içeriği ile bağlantı göstermemiştir. Markörün seçiciliğinin aynı bölgede bulunan erkek kısırlığından sorumlu gen (*Ms*) ile bağlantılı olabileceği öngörülmektedir.

Yıl :2016
SayfaSayısı 62
Anahtar Kelimeler : Aspir, Oleik asit, MAS, Yağ asitleri, Moleküler Islah

Master's Thesis
Merve GUZEL
Trakya University Institute of Natural Sciences
Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

The safflower (*Carthamus tinctorius* L.) which belongs to Compositae family is an annual oil plant which is noted for its drought resistance.The stems, leaves, flowers and seeds of the safflower have been used in different areas.Oleic types of oils has a higher smoke points. For that reason, types of oleic oils (Omega-9) are prefered by consumers for healthy frying oil around the world. High oleic safflower oil can be developed classical plant breeding studies, but this process involves a long period of time. Biotechnological methods especially marker assisted selection (MAS) could be used fast and efficiently in the development of new varieties. In this study; it's aimed to determined molecular markers which are detect high and low oleic safflower genotypes.High and low oleic type two safflower lines hybridized and DNA was isolated from leaves of their selected F_2 offspring seedlings. In the literature, SCAR markers linked to *FAD2* and *Ol* genes which controls safflower oil contents were selected for this study and plant materials were scanned by these markers.Results of the oil content analysis and SCAR marker bant profiles of the parents and theirF_2 individuals were matched and evaluated for detection of the selective markers that can be used for breeding. Theobtained results from our studies show that IASCA 73 SCAR markers was codominant selective marker between genotypes however it was not related to oil traits. It is expected that the selectivity of the markers can berelated to male sterility gene (*Ms*) in the same loci.

Year :2016
NumberofPages 62
Keywords : Safflower, Oleic acid, MAS, Oil acids, Molecular Breeding

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr.Yalçın KAYA başta olmak üzere, Doç.Dr.Semra HASANÇEBİ ve Yrd. Doç. Necmi BEŞER hocalarıma aklıma takılan bütün sorulara sabırla cevap verip yol gösterdikleri için teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarımda yardımını esirgemeyen ve pes etmeme izin vermeyen Ziraat Teknikeri Mahmut ÇEBİ'ye, yanımda olan ailem ve dostlarıma teşekkür ederim.

Merve GÜZEL
Edirne, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET I

ABSTRACT II

TEŞEKKÜR III

İÇİNDEKİLER IV

SİMGELER VI

KISALTMALAR VI

ŞEKİLLER DİZİNİ VIII

TABLOLAR DİZİNİ IX

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4

GENEL BİLGİLER 4

2.1. Aspir Bitkisi 4

2.1.1. Orjini ve Yabani Türleri 4

2.1.2. Genetik Yapısı, Islahı ve Melezleme Tekniği 9

2.2. Oleik Yağ Asidi - Omega-9 (9-Cis-Oktadecenoic Asid) 14

2.2.1. Oleik Yağ Asidi Sentezi 14

2.2.2. Aspirde Yağ İçeriğinin Genetik Kontrolü 16

2.2.3. Oleik Yağ Asidi Miktarini Etkileyen Faktörler 19

2.2.4 Oleik Yağ Asidinin Kullanım Alanları 21

2.3. Aspirle İlgili Yapılan Çalışmalar 24

2.3.1. Marköre Dayalı Seleksiyon (MAS) 25

2.3.2. Moleküler Çalışmalar Aspirde 27

BÖLÜM 3 30
MATERYAL VE METOT 30
3.1. Materyal ve Melezleme Çalışmaları 30
3.2. DNA İzolasyonu 33
3.3. SCAR Markör Analizleri 36
3.3.1. PCR Optimizasyonu 38
3.3.2. PCR Karışımı 38
3.3.3. Primerlerin Optimum Bağlanma Sıcaklığının Belirlenmesi 39
3.4. Yağ Asidi Analizleri 39
BÖLÜM 4 42
SONUÇLAR ve TARTIŞMA 42
4.1. Genomik DNA izolasyonu 42
4.2. Markör Analizleri 43
4.3. Yağ Analizleri 47
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 62

SİMGELER

mM	**:**Milimolar
µl	**:**Mikrolitre
ng	**:**Nanogram
U	**:**Ünite
V	**:**Volt
cM	**:**Santimorgan
mm	**:**Milimetre

KISALTMALAR

ACP	:Acyl Carrier Protein
AFLP	:Amplified Fragment Lenght Polymorphism
ALD	:Adrenoleukodystrophy
CAPS	:Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CoA	:Koenzim A
EDTA	:Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EST	:Expressed Sequence Taq
FAD2	:Fatty Acid Desaturase-2
Ha	:Hektar
HDL	:High Density Lipoprotein
ISSR	:Inter Simple Sequence Repeat

LDL :Low Density Lipoprotein

NADH :Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADPH :Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NMS :Nuclear Male Sterility

PCR :Polymerase Chain Reaction

RAPD :Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP :Restriction Fragment Length Polymorphism

SCAR :Sequence Characterized Amplified Region

SACPD :Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase

SSR :Simple Sequence Repeats

TBE :Tris Borikasit EDTA

Tm :Erime Sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aspir formları 7

Şekil 2.2. Aspir tablasında açmış, tozlanmayı tamamlamış çiçekçikler 10

Ş**ekil 2.3**. Bir aspir çiçekçiğinin uzunlamasına kesiti 11

Şekil 2.4. Oleik yağ asidini gösteren bir örnek oluşum 15

Şekil 2.5. Bitki hücrelerindeki plastitlerde gerçekleşen oleik asit sentez döngüsü 16

Şekil 3.1. Aspirde emaskülasyon 31

Şekil 3.2. Aspirde toz verme, melez tohumlar 32

Şekil 3.3. Laboratuvar çalışmaları 33

Şekil 3.4. Doku parçalama 34

Şekil 3.5.DNA izolasyonu 34

Şekil 3.6.DNA yoğunluk ölçümü 36

Şekil 3.7.GC yağ aside ölçümleri 40

Şekil 3.8. GC de yağ asidi ölçümleri 41

Şekil 4.1. Aspir genomic DNA'ların agaroz jel görüntüsü 42

Şekil 4.2. IASCA 74-1 43

Şekil 4.3. IASCA 74-2 44

Şekil 4.4. IASCA 73-1 44

Şekil 4.5. IASCA 73-2 45

Şekil 4.6. IASCA 37-1 45

Şekil 4.7. IASCA 37-2 46

Şekil 4.8. IASCA 39-1 46

Şekil 4.9. IASCA 39-2 47

Şekil 4.10. IASCA 73-1 ile linoleik yağ içeriklerinin değerlendirilmesi 50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Yıllara göre Türkiye aspir ekim alan ve üretim miktarları 1

Tablo 1.2. Dünya aspir üretimi 2

Tablo 3.1. Melezde ana olarak seçilen bitkiler 31

Tablo3.2. Melezde baba olarak seçilen bitkiler 31

Tablo 3.3. Melez kombinasyonları 33

Tablo 3.4. PCR metodunda kullanılacak primer setleri 38

Tablo3.5.PCR karışımını oluşturan bileşenler ve son konsantrasyonlar 39

Tablo 3.6. PCR çalışmasında uygulanan PCR koşulu 40

Tablo 4.1. Yağ asidi analiz sonuçları 48

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Yerli bir bitki olan aspirin yetiştirilme koşulları ülkemizin ciddi boyutlardaki bitkisel yağ açığı için önemli avantajlar sunmaktadır. Aspir kıraç toprakta, susuz tarımla yetiştirilebilmektedir. Bitkinin kurağa, soğuğa ve tuzluluğa karşı diğer yağ bitkilerine oranla daha toleranslı olması ülkemizdeki yağ bitkileri açısından önemini arttırmaktadır.

Tarım Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü'nün verdiği verilere göre; 2008 yılında ekim alanı 5.000 hektar olan aspir, 2014 yılında 62.000 hektar ekilmiştir. Bununla doğru orantılı olarak 2008 yılında 7.000 ton üretilmiş, 2015 yılında ise üretim miktarı 70.000 tona çıkmıştır [1,2]. Bu üretimin 644 tonu tohum üretim miktarıdır. (Tablo 1.1)

Tablo 1.1. Yıllara göre Türkiye aspir ekim alan ve üretim miktarları [2]

Aspir	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Ekim alanı (1000 ha)	5	-	14	13	16	29	44	-
Üretim (1000 ton)	7		26	18	20	45	62	70
Tohum üretim miktarı (ton)		248	397	269	250	750	807	644

2013 yılı verilerine göre Dünya aspir ekim alanı 816.588 hektar, üretim 670.319 ton ortalama verim ise 83 kg/da'dır. Aspir üretimi yapan bazı ülkelere ait Tablo 1.2 incelendiğinde ekim alanları bakımından ilk sırayı 276.500 hektar ile Kazakistan almakta olup bu ülkeyi sırası ile Hindistan, Arjantin, Meksika, A.B.D., Türkiye, Tanzanya, Çin takip etmektedir. Dünya aspir üretiminde ilk

sırayı %27'lik pay ile Kazakistan, %16,8' lik pay ile Hindistan almaktadır. Bu ülkeleri sırasıyla A.B.D (%14,7), Meksika (%14,2), Arjantin (%7.7), Türkiye (%7) takip etmektedir [3]

Tablo 1.2. Dünya aspir üretimi [3]

Ülkeler	Ekim Alanı (hektar)	Üretim (ton)
Kazakistan	276.500	174.900
Hindistan	150.000	109.000
Arjantin	87.470	49.770
Meksika	80.454	91.788
A.B.D.	68.800	95.000
Türkiye	29.292	45.000
Tanzanya	24.000	13.000
Çin	23.000	36.000
Kırgızistan	14.000	12.863
Etiyopya	6.600	6.711
Dünya	816.588	670.319

Türkiye'de ve dünyada en çok kullanılan yağlar linoleik yağ asidi yüksek (omega-6) (pamuk, ayçiçeği, mısır, yerfıstığı, soya gibi) yağlardır. Bu tipteki yağların yanma dereceleri düşüktür. Tekrarlanan kızartma işlemleri sonucunda yağın kimyasal yapısı değişerek kanserojen bileşikler meydana getirmekte, yanan yağ insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu sebeple, kızartma işleminde zararı en aza indirgenmiş, ekonomik yağ eldesi oldukça önemlidir. Oleik tipteki (omega-9) yağların yanma derecesi linoleik tipteki (omeg-6) yağlara göre daha yüksektir. Bu yüzden oleik tipteki yağlar kızartma işlemi için uygun yağlardır. Klasik ıslah çalışmaları ile oleik asit miktarı yükseltilmiş çeşitler elde edilebilmekte, fakat bu süreç

uzun bir zaman dilimini kapsamaktadır.Oleik asit tüketiminin insan sağlığı için önemi fark edildikçe oleik miktarı arttırılmış çeşitlerin önemi idrak edilmiştir. Bu sebeple ıslahçılar oleik miktarı arttırılmış çeşitleri geliştirmek için uğraşmaktadırlar.

Islah çalışmalarının en büyük sorunu melezlenen bitkilerin istenilen karaktere sahip olup olmadığının belirlenmesi aşamasıdır. Bunun için tohumun ekilmesi ve hasat edilmesinin ardından elde edilen tohumların analiz edilmesi gerekmektedir. Bu aşamada zaman kaybı olmaktadır. Moleküler markörler yardımı ile istenilen genin varlığı ya da yokluğu kontrol edilerek, daha kısa sürede istenilen sonuca ulaşılabilmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Aspir Bitkisi

Aspir(*Carthamus tinctorius* L.), sarı, turuncu, kırmızı, beyaz olmak üzere değişik renklerde çiçeklere sahip, otsu yapıda, dallanabilen, ve her dalın ucunda içerisinde ortalama 30-40 adet tohum oluşturabildiği tablalar bulunan, tohumlarında % 20-50 arasında yağ içeren, oleik ve linoleik tipleri bulunan, deve dikeni görünümlü, kendine döllenebilen, çok derinlere gidebilen güçlü bir kazık kök sistemi sayesinde, sıcak ve kurak mevsimlerde hayatını devam ettirebilen ve gelişmesini tamamlayabilen, 30-150 cm arasında boylanabilen, tek yıllık bir yağ bitkisidir [4,5,6].

Aspir bitkisi, yüzyıllardır bölgesel olarak, kumaş boyası, gıda boyası ve aynı zamanda dini törenlerde de kullanılan turuncu-kırmızı renkli "Kartamin" adı verilen boyanın elde edildiği çiçekleri için yetiştirilmektedir [7]. Çiçeklerinden elde edilen ekstraklar, gıdalara lezzet vermek amacıyla kullanıldığı gibi, tarih boyunca tıbbi açıdan da önemli bir yere sahip olmuştur. A.B.D' nin de yer aldığı Yeni Dünya kıtasında ilk aspir yetiştiriciliği 1899 yılında başlamasına rağmen, ticari anlamda bir yağ bitkisi olarak yetiştirilmesi 1950 yılında başlamıştır [8].

2.1.1. Orjini ve Yabani Türleri

Bugün hiç kimse tam olarak, aspir bitkisinin ne kadar zaman önce ve nerede kültüre alındığını bilmemektedir. Yaklaşık 4.000 yıl önce, Mezopotamya'nın da dahil olduğu "Bereketli Hilal" bölgesinde kültüre alındığına inanılmaktadır [5]. İlk defa Mısır'da kültüre alındığı ile ilgili bilgiler daha fazla kabul görmektedir. İlk kültüre alındığı bölgeden hem doğu hem de batı yönüne genişleme gösterdiği düşünülmektedir. Bu amaçla, Uzak Doğu, Hindistan-Pakistan, Orta Doğu, Mısır, Sudan, Etiyopya ve Avrupa olmak üzere, coğrafi olarak 7 farklı "Benzerlik

Merkezi" olduğu fikri ortaya atılmıştır [9]. Her bir merkez içerisinde yer alan aspir materyalleri, bitki boyu, dallanma, dikenlilik, çiçek rengi ve tabla büyüklüğü açısından birbirine benzerlik gösterse de, merkezler arasındaki morfolojik farklılıklar, her zaman mevcuttur. Bu merkezler içerisinde yer alan bölgeler aşağıdaki gibidir.

Uzak Doğu: Çin, Japonya ve Kore

Hindistan-Pakistan: Hindistan, Pakistan ve Bangladeş

Orta Doğu: Afganistan'dan Türkiye'ye, eski Sovyetler Birliği'ninGüney Cumhuriyetleri'nden Hint Okyanusu'na kadar olan bölge

Mısır: Aswan bölgesinin kuzeyi ve Nil nehri sınırı

Sudan: Kuzey Sudan'da Nil nehri sınırı ve Mısırın güneyi

Etiyopya: Etiyopya

Avrupa: Cezayir, Fransa, İtalya, Fas, Portekiz, Romanya ve İspanya

Vavilov (1952) kültürü yapılan aspir bitkisinin (*Carthamus tinctorius* L.), Hindistan, Afganistan ve Etiyopya olmak üzere 3 gen merkezi olduğunu önermiştir. Daha sonra, Kupzow (1932), aynı merkezleri önermiştir.

Bugüne kadar, Carthamus türlerinin filogenetik araştırmaları, ya cins içerisindeki seksiyonların sınırlarını belirlemek ya da aspir çeşitleri arasındaki ilişkileri araştırmak için DNA parmak izi metodolojisinin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır [10,11,12]. Her bir seksiyon (cins ile tür arasında bir grup) içerisindeki, birbirine yakın akraba türlerin birbirleriyle ilişkileri tam olarak anlaşılamamış olup, ayrıca, orijin ve ilk evrimi hakkında detaylı bilgiler hala eksiktir.

Günümüzde aspir bitkisinin, batı ve kuzeybatıda, Orta Anadolu'dan Lübnan ve İsrail'e ve doğuda Hindistan'a kadar uzanan bölgede yer alan ve birbirleriyle yakın ilişki içerisinde olan diploid (2n=24 kromozom) tür, *Carthamus*'a ait olduğu bilinmektedir [13]. *Carthamus tinctorius*'a ilave olarak, bu seksiyon içerisinde, *C. curdicus Hanelt, C. gypsicola* Iljin, *C. oxyacanthus* Bieb. (= *C. oxyacantha*M.Bieb.), *C. palaestinus* Eig, ve *C.*

persicus Desf. Ex Willd. (= *C. flavescens Spreng*) da yer almaktadır [11]. Bu türler birbirleriyle belirli bir dereceye kadar melezlenebilmektedir. *Carthamus curdicus* ve *C. palaestinus* türleri genellikle, sırasıyla Kuzey ve Güney İsrail'de yaygın iken, *C. persicus, C. gypsicola* ve *C. oxyacantha* türleri daha çok, geniş olarak, Orta Doğu bölgesinde yaygın olarak görülmektedir [14]. Aspir bitkisinin orijini üzerindeki araştırmalarda, *C. persicus* türünün muhtemel atası olarak önerilse de, esas olarak *C. oxyacantha* veya *C. palaestinus* üzerinde yoğunlaşmıştır. En son yapılan çalışmalarda, günümüzde yetiştiriciliği yapılan tür olan *Carthamus tinctorius*'un, muhtemelen, yabani bir tür olan *C. palaestinus*'tan türemiş olduğu ve aspir bitkisinin atası olarak kabul edilmesi gerektiği görüşü hakim duruma gelmiştir [6,12,15].

Günümüzde kültürü yapılan *Carthamus tinctorius*, *C. oxyacantha, C. palaestinus* ve *C. flavescens* ile çok yakın akraba olup, kromozom sayıları 24 tür. *C. flavescens (= C. persicus)* ve *C. oxyacantha* türleri, sırasıyla Türkiye, Suriye ve İran' da ve Irak'tan Kuzey batı Hindistan'a kadar olan geniş alanlarda yabancı ot olarak, yaygın olarak yetişmektedir. *C. palaestinus* ise, İsrail'den batı Irak'a kadar uzanan çöl alanlarda yaygın olarak yetişmektedir. Bu 4 tür de [*C. tinctorius, C. oxyacantha, C. palastinus* ve *C. flavescens (= C. persicus)],* birbirleri arasında kolaylıkla melezlenebilmekte ve tohum alınabilmektedir. Bu durum, özellikle bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık veya toleranslılık açısından ıslah çalışmalarında, yabani formlardan gen aktarılmasında önemli bir olaydır [4, 6, 12].



Şekil 2.1. Aspir formları-*Carthamus tinctorius* L.(Kültür), *Carthamus oxyacantha* (Yabani)

İlk yapılan çalışmalarda, *Carthamus* cinsinin 60 farklı türünün olduğu ifade edilmiş olmasına rağmen [16] daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, bu sayı 25'e düşürülmüştür. Vilatersana ve arkadaşlarının [10] yaptıkları moleküler analizlerde, yabani türlerin 18 adet olduğunu ve bunların kromozom sayılarına göre 4 guruba ayrılması gerektiğini önermiştir. *Carthamus tinctorius* L., yani bugün yetiştiriciliği yapılan tür içerisinde hem dikenli hem de dikensiz tipler olmasına rağmen, bu tür haricindeki bütün türler dikenli olup, içerisinde dikensiz formları yoktur. Kısacası günümüzde dünya üzerinde değişik bölgelere yayılmış ve sadece o bölgeye has hale gelmiş 25 farklı aspir yabani türünün olduğu bilinmekte ve kabul edilmektedir [4, 6]. Var olan bu 25 yabani türden, 11 tanesi, kromozom sayılarına, morfolojilerine ve melezlenme kolaylığına göre, 4 gruba ayrılmıştır [17]. Daha sonra, bazı araştırıcılar, türleri 5 grupta toplamışlardır. Bazı türlerin kromozom sayıları tartışmalı ve alt türlerde olduğundan aşağıda, örnek olarak 16 ana tür verilmiştir.

Grup I (2n=24): *C. oxyantha, C. palaestinus, C. tinctorius, C. nitidus* ve *C. flavescens*

Grup II (2n=20): *C. alexandrinus,C. glaucus,C. syriacus,C. tenuis ve*

C. analoticus

Grup III (2n=22): *C. divaricatus*

Grup IV (2n=44): *C. lanatus*

Grup V (2n=64): *C. baeticus. C. arborescens, C. caeruleus ve C.turkestanicus*

Yabani türlerin 3 temel kromozom sayısına (x= 10, x=11 ve x=12) sahip olduğu kabul edilmektedir. Diploid (2n= 2x) formları olduğu gibi, poliploid (2n= 4x, 2n= 6x) formları da Dünya üzerinde farklı bölgelere yayılmış durumdadır. *C. tinctorius* türü de dahil olmak üzere, yabani türlerin büyük bir çoğunluğu diploid formundadır. Diploid formlar, örneğin *Carthamus tinctorius*, 2n=2x=20, 2n=2x=22 ve 2n=2x=24 şeklinde genom yapısına sahip olabilirler. Fakat, bugün dünya üzerinde yetiştiriciliği yapılan *C. tinctorius*, 12 temel kromozom sayısına (x=12) sahip olup, 2n=2x= 24 kromozomludur. Kültürü yapılan aspir bitkisinin atası, diğer bir ifadeyle gen kaynağı olarak kabul edilen, *C. oxyacantha, C. palastinus ve C. flavescens (= C. persicus)* türleri de, 2n=2x= 24 kromozomlu olup diploid formundadırlar [6, 9, 12, 17].

Carthamus leucocaulos ve *C. glaucus* gibi yabani türler, 10 temel kromozom sayısına (x=10) sahip olup, 2n=2x= 20 olup diploid formundadırlar. Temel kromozom sayısı 11 olan (x=11) tek *tür C. divaricatus*, sadece Libya'da sınırlı bir alanda doğal olarak yetişmektedir. Bu türde, beyaz ve sarı çiçek rengi yanında, pembe çiçek rengini de görmek mümkündür. Kendisiyle uyuşmazlık problemi olup, temel kromozom sayısı 10 olan türlerle melezlendiğinde kısmen fertil yavrular elde edilebilmektedir. *C. tinctorius* ile melezlenmesi mümkündür ancak, elde edilen yavru döller tamamen sterildir. Diğer bir tür olan ve ülkemizde Trakya bölgesinde yaygın olarak yetişen *C. lanatus*,poliploid formunda olup, 2n=2x= 44 kromozomludur. Bu türün, 2n= 20 ve 2n= 24 kromozomlu türler arasındaki melezlenmeden ve daha sonraki kromozom katlanmasından ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. *C. turkestanicus*ve*C. baeticus* türleri ise, yine poliploid formunda olup, 2n=2x= 64

kromozomludur. Bu türlerin ise, *C. lanatus*(x=22) ile 2n=20 kromozomlu bir türün melezlenmesi sonucu ortaya çıkmış olabileceği tahmin edilmektedir [6, 9, 17, 18, 19]. Bu türler de, ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır.

Dünya üzerinde mevcut olduğu kabul edilen 25 türden sadece *Carthamus tinctorius L*. türü, yağ bitkisi olarak bütün Dünya'da tarımı yapılan tek kültür formudur. Bu tür, beyaz, kırmızı, sarı ve turuncu gibi çiçek renklerine sahiptir. Diğer bütün türler ise, dünyanın farklı bölgelerinde, ülkemiz de dahil olmak üzere, doğal olarak yabancı ot formunda yetişmektedir. Bu türlerde ise, kültür formunun sahip olduğu çiçek renkleri yanında, mavi, mor, ve pembe gibi çiçek renklerini de görmek mümkündür.

Çiçek renkleri yanında türler arasında, tohum renkleri açısından da geniş bir varyasyon bulunmaktadır. Örneğin, kültür formunun tohumları genellikle beyaz ve krem renklerinde olduğu halde, yabani türlerde, koyu kahve, açık kahve, gri ve siyah gibi renklerde tohum görmek mümkündür. Bu yabani türler, ıslah çalışmalarında gen kaynağı olarak değerlendirilmektedir [6, 9, 18, 19].

2.1.2. Genetik Yapısı, Islahı ve Melezleme Tekniği

Aspir bitkisi (*Carthamus tinctorius* L.)diploidformunda, temel kromozom sayısı x= 12 olup, toplam kromozom sayısı ise, 2n=2x=24 dür [17]. Çiçekleri, tabla şeklinde dalların ucunda yer almaktadır. Tabla üzerinde ise, çok sayıda çiçekçik yer almaktadır. Bu sayı, çeşitlere göre, yetişme şartlarına göre değişiklik gösterebilir. Çiçekçikler tüp şeklinde olup, döllenme sonucu her biri tohum bağlayabilmektedir. Çiçekçiklerde, 5 adet çanak yaprak, 5 adet taç yaprak, 1 adet dişi organ ve 5 adet de erkek organ bulunmaktadır. Beş adet erkek organ birleşik halde bir tüp şeklindedir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3) Dişi organ bu tüp içerisinde uzayarak, anter keseciklerinin patlamasıyla polene bulanarak tozlanmaktadır. Tozlanmayı takip eden 2 saat içerisinde, polen tanesi dişi organ üzerinde

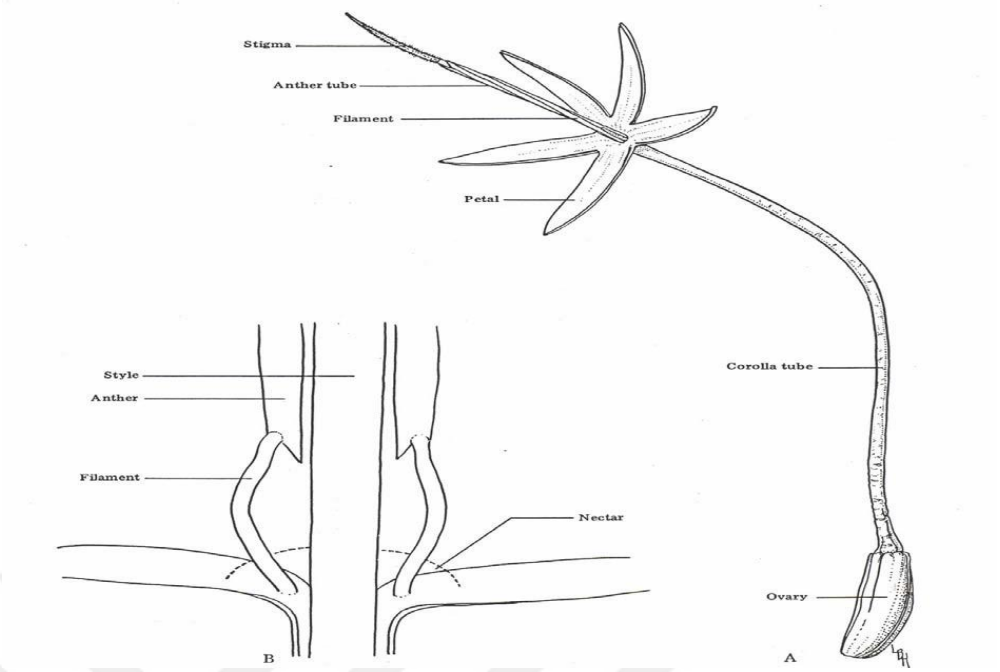
çimlenerek dişicik borusu içerisinde ilerler ve yumurtalığa ulaşarak döllenme işlemi tamamlanır[6,20].

Tabla içerisinde çiçeklenme en dış sıradan başlayarak, tablanın merkezindeki sıralara doğru ilerler. Bu süre tek bir tabla için 3-4 gün ile 1 hafta arasında değişebilir. Bir bitkideki tablaların tamamının çiçeklenmesi, yetişme şartlarına bağlı olarak 4 haftaya kadar sürebilir. Kendine döllenen bir bitkidir. Kendine döllenme oranı % 100' lere ulaşabildiği gibi, çok ekstrem şartlarda, genotipe ve böceklerin faaliyetlerine bağlı olarak, örneğin, dişi organın tüp içerisinde yukarı doğru uzaması sırasında, anter keseciklerinin eş zamanlı olarak olgunlaşmaması nedeniyle patlayarak erkek tozu verememesi sonucu, tozlanamadan uzayan dişi organın, bir böcek yardımıyla tozlanması nedeniyle, bir miktar yabancı tozlanma da görülebilir. Yabancı tozlanmada rüzgarın herhangi bir rolü yoktur [6, 12, 20, 21].

Kendine döllenen bir bitki olduğu için, aspir ıslahında da kendine döllenen bitkilerde uygulanan ıslah metotları uygulanmaktadır. Amaç bir varyasyon içerisinden arzu edilen tek bitkilerin seçilerek saflaştırılmasıdır.



Şekil 2.2. Aspir tablasında açmış ve tozlanmayı tamamlamış çiçekçikler



Şekil 2.3. Bir aspir çiçekçiğinin uzunlamasına kesiti. **A:**Çiçekçik, **B:** Tamamen büyütülmüş anterler ve dişi organ.**Style, Stigma:** Dişi Organ, **Ovary:** Yumurtalık (tohum taslağı), **Anther:** Erkek organ, **Petal:** Taç Yapraklar, **AntherTube:** Anterlerin birleşmesiyle oluşmuş tüp şeklinde yapı, **Corolla Tube:** Tozlanmadan sonra çimlenen polenin aşağıya doğru uzayarak indiği dişicik borusu

Bu nedenle, var olan bir varyasyon içerisinden, dünyanın farklı bölgelerinden toplanmış aspir popülasyonları içerisinden tek bitki seçilerek (saf hat seleksiyonu) çeşit geliştirme, diğer bir ifadeyle seleksiyon metodu en fazla başvurulan metotlardan birisi olup hala yoğun olarak kullanılmaktadır.Bunun yanında, yine varyasyon oluşturmak için en çok kullanılan metot melezlemedir. Bu yolla, farklı ebeveyn bitkilerde bulunan özelliklerin melezleme yolu ile (kombinasyon ıslahı) tek bir bitkide toplanması amaçlanmaktadır.

Varyasyon oluşturmak için kullanılan bir diğer metot mutasyon ıslahıdır. Mutasyon amacıyla genellikle Kobalt 60 ışını kullanılmaktadır. Böylece, mutasyon sayesinde bitkide bulunan kromozomlar ve üzerindeki genler yeniden dizilerek farklı bireyler oluşmaktadır.

Aspir ıslahında, belirli amaçlar doğrultusunda melezleme programı yapılır. Aspir ıslahında temel amaçlar şunlardır [6, 12, 20].

- Yüksek tane verimi
- Yüksek yağ oranı
- Yüksek oleik yağ asidi
- Erkencilik
- İnce kabuk
- Dikensizlik
- Hastalıklara dayanıklılık (özellikle pasa dayanıklılık)
- Zararlılara dayanıklılık (özellikle aspir sineğine dayanıklılık)

Arzu edilen karakterlere sahip çeşitlerden biri ana diğeri de baba ebeveyn olarak belirlenir ve melezleme işlemi yürütülür. Ana olarak kullanılacak ebeveyn üzerinde emaskülasyon işlemi (erkek organların uzaklaştırılması) yapılmak zorundadır. Bu işlem, tozlama yapılmadan bir gün önce akşamüzeri yapılmalıdır [6, 20, 21]. Bir makas ve cımbız yardımıyla bu emaskülasyon işlemi gerçekleştirilir. Ana olarak kullanılacak bitkideki tablalarda yaklaşık 5-6 çiçekçik açmaya başlamış ise, emaskülasyon için uygun zaman demektir. Bu tip tablalar, bir sivri uçlu makas yardımıyla, tablanın alt kısmından 3-4 mm yukarıdan dairesel olarak kesilerek açılır ve açmış çiçekler ile aynı sırada bulunan diğer çiçekler, kendilenme riskine karşı tabladan cımbız yardımıyla uzaklaştırılır. Kalan tüp şeklindeki açmamış çiçekçikler, boğumlarından veya hemen 2-3 mm altından cımbız ucu ile tutulur ve kendi üzerine bükülerek o noktadan kırılması sağlanır. Daha sonra, cımbız ucu ile hafifçe tutularak yukarıya doğru itilir ve dişi organın açığa çıkması sağlanır. Her tablada, yaklaşık 8-20 arası çiçekçik emasküle edilir ve geri kalanlar cımbız yardımıyla tabladan uzaklaştırılır. Emasküle edilen tablalar, herhangi bir yabancı tozlanma riskine karşı yağlı kağıttan yapılmış bir kese kağıdı ile kapatılır. Kese kağıdı üzerine, melezleme yapılacak ana ve baba ebeveynler yazılır. Aynı gün, baba olarak kullanılacak bitkiden alınan tablalar saplı

olarak kesilir ve bir kapta su içerisinde ertesi güne kadarbekletilir. Babalar ertesi sabah saatlerinde anter keseciklerini patlatacaklardır ve tozlama için gerekli polenler hazır hale gelecektir. Ertesi sabah, toz vermiş olan baba bitkinin tablaları, ana olarak hazırlanan tablalardaki dişi organa aşağıdan yukarıya doğru nazik bir şekilde sürülür. Dişi organ tırtıklı olduğu için, polen tozlarını hemen tutacaktır. Tozlama işleminden hemen sonra, ana bitkinin tablaları kese kağıdı ile tekrar kapatılır [6, 12, 20].

Tozlama işleminden yaklaşık 8-10 gün sonra, tohum tutma kontrol edilir. Eğer tohum oluşumu gerçekleşmiş ise, melezleme başarılı, eğer tohum oluşumu gerçekleşmemiş ise melezleme başarısız olmuş sayılır [6, 12, 20]. Tohum tutmanın gerçekleşmiş olması tek başına melezlemenin başarılı olduğunu göstermez. Bunun yanında, ebeveynlerde bulunan dominant karakterlere göre de melez kontrolünün yapılması zorunludur. Çünkü dominant karakterler F_1 kademesinde kendini gösterir. Bazı dominant karakterler şunlardır; koyu çiçek renkleri beyaz çiçek rengine; koyu tohum renkleri beyaz tohum rengine; dikenlilik, dikensizliğe; beyaz tohum, çizgili tohuma; uzun boyluluk, kısa boyluluğa; linoleik yağ asidi, oleik yağ asidine dominanttır. Yapılan melezlemenin doğru olup olmadığını anlamak için, dominant karaktere sahip ebeveyn her zaman baba olarak kullanılmalıdır. Bu durumda, örneğin dikensiz bir ebeveynle dikenli bir ebeveyn melezlendiğinde F_1'lerin hepsi dikenli değilse, o melez yanlıştır.

Ana bitkinin tablalarından alınan melez tohumlar, yıllar itibariyle ekilerek, uygulanacak seleksiyon yöntemine göre F_6 veya F_7 kademesine kadar getirilir ve durulma sağlanan hatlar (% 97-98'lik homozigotluk) sırasıyla, ön verim, verim ve bölge verim denemelerinde mevcut çeşitlerle, arzu edilen karakterler açısından kıyaslamalı olarak test edilir. Yapılan değerlendirmelerde mevcut çeşitlerden üstün olduğu belirlenen hatlar tescile teklif edilerek aspir çeşit ıslahı gerçekleştirilmiş olur. Uzun yıllardır seleksiyon işlemi sadece morfolojik görünüme (gözle görülebilen karakterler) göre yapılmakta olup ancak, son yıllarda biyoteknoloji sayesinde bazı karakterlerin, örneğin yağ oranı, yağ asitleri ve hastalığa dayanıklılık gibi, daha fide döneminde iken markör yardımıyla belirlenmesi, ıslah çalışmalarında seleksiyonun başarı oranını arttırmış ve seleksiyonlar daha bilinçli olarak yapılmaya başlanmıştır [6,12,15].

2.2. Oleik Yağ Asidi - Omega-9 (9-Cis-Oktadecenoic Asid)

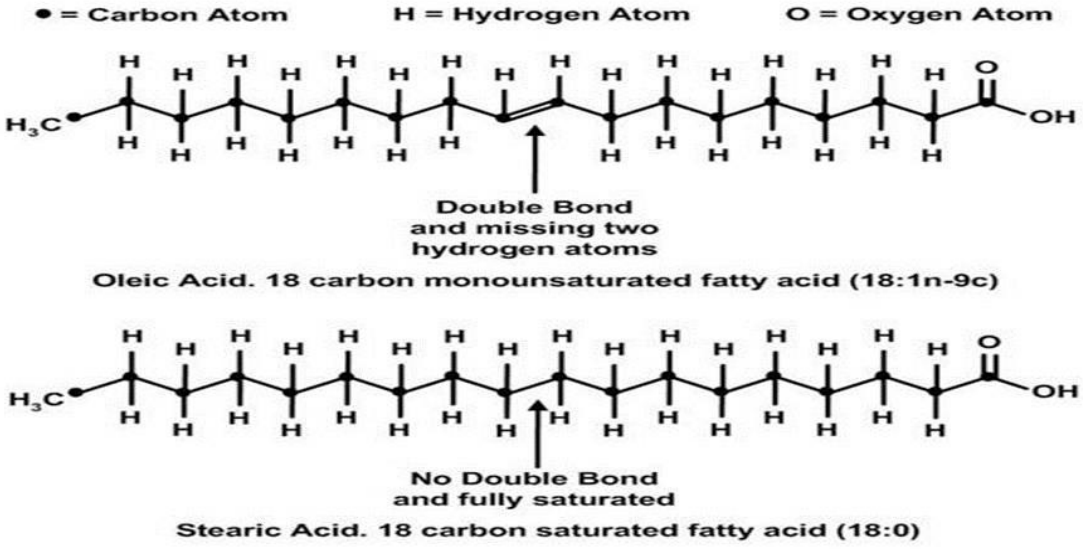
Oleik yağ asidinin kimyasal yapısı, $CH_3 (CH_2)_7 CH=CH(CH_2)_7COOH$ şeklinde ve karbon atomu sayısı 18 olup, yapısında 9. ve 10. karbonlar arasında bir tek çift bağ bulundurmaktadır ve C 18:1 olarak ifade edilmektedir. Bilinen en önemli oleik asit kaynağı, zeytin yağıdır [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

En önemli oleik yağ asidi (omega-9) kaynağı olarak zeytin yağı bilinmesine rağmen, oleik yağ asidi içeren ayçiçeği, aspir, yerfıstığı, soya ve kolza gibi bitkilerin oleik tipleri bugün dünya üzerinde farklı bölgelerde ekilmektedir [30].

2.2.1. Oleik Yağ Asidi Sentezi

Yağ bitkilerindeki oleik yağ asit miktarı gliserol tarafından kontrol edilmektedir [31]. Bitkilerde yağ asitleri biyosentezi, sadece hücre içerisinde yer alan plastitlerde gerçekleşmektedir. Bu işlem, çözülebilir SACPD (Stearoyl-Acyl Carrier Protein-Desaturase) enziminin aktif olduğu durumda gerçekleşir.

Tekli doymamış yağ asidi olan oleik yağ asidini (18:1) oluşturmak için, bu enzim, doymuş yağ asidi olan stearik asidin (18:0) karbon 9 konumuna bir adet cis-isomer çift bağ (cis-isomer çift bağlarda, bağlar bir arada değil, aralarında bir metilen ayırıcı vardır) girmektedir. Diğer bir ifadeyle, bu SACPD enzimi, çift bağ içermeyen doymuş yağ asitlerine, ki bunların karbon sayıları 16 veya 18 dir, tam ortadan yani 9. karbondan bir çift bağı içerideyer alır. 9. Karbon olmasının sebebi; oleik yağ asitleri tek bir çift bağ içermektedir ve bu çift bağ 9. ve 10. karbonlararasındadır. Örneğin, 18 karbonlu ve hiç çift bağ içermeyen doymuş yağ asidi olan stearik aside (18:0), SACPD enziminin aktif olması sayesinde tam ortadan 9. karbon konumundan bir adet çift bağ eklenir. Bu durumda doymuş yağ asidi, stearik asit (18:0), bir çift bağ kazanarak yine 18 karbonlu tekli doymamış bir yağ asidi olan oleik yağ asidine (18:1) dönüşmektedir [31, 32, 33, 34].

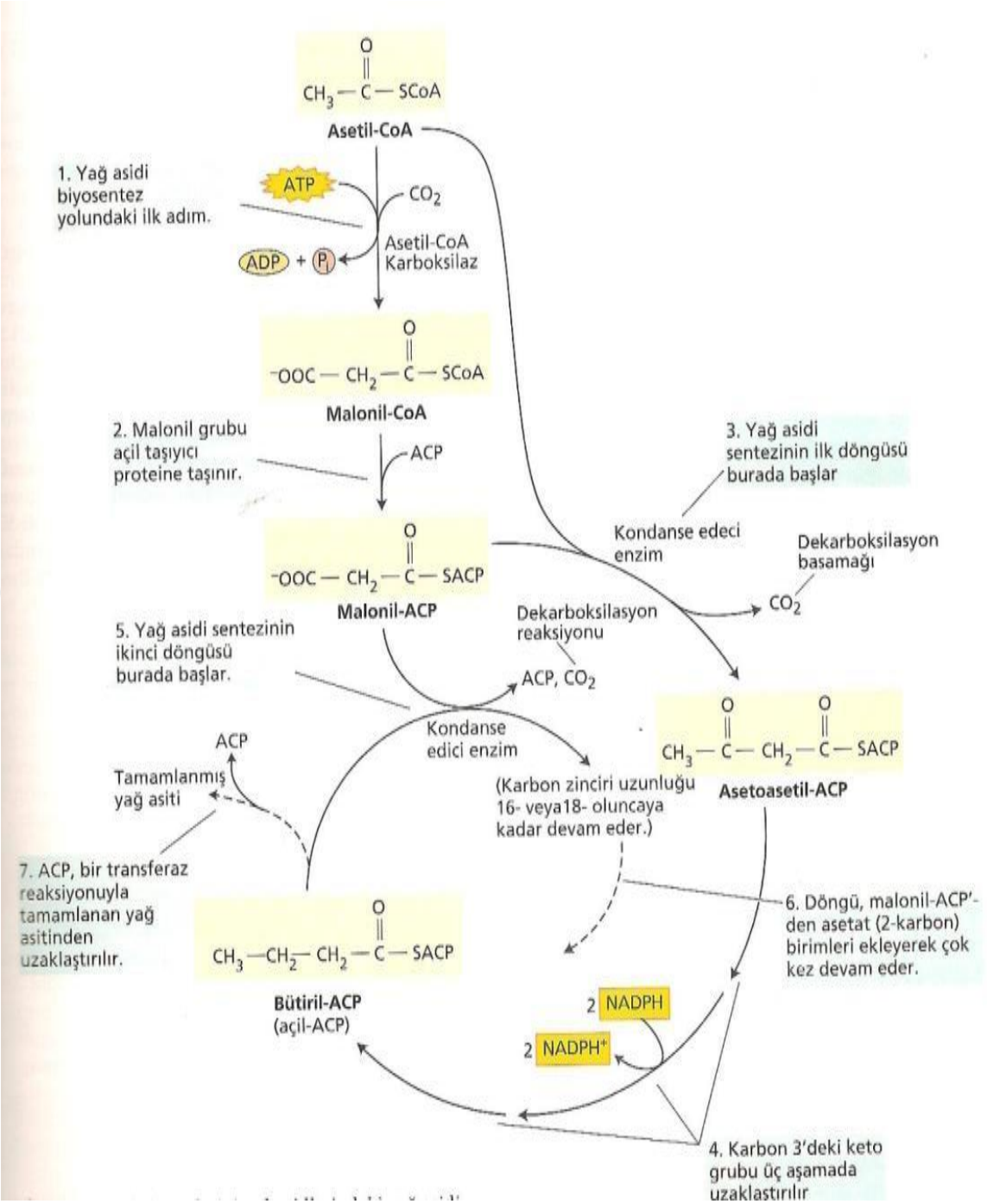


Şekil 2.4. SACPD enziminin aktif olarak yer aldığı, doymuş yağ asidine, bir çift bağ eklenmesiyle oluşan bir tekli doymamış oleik yağ asidini gösteren bir örnek oluşum [31, 32, 33, 34].

Bitkilerde bu dönüşümün gerçekleşebilmesi için, ilk basamak, AsetilCoA'nın geri dönülmez bir reaksiyonla, MalonilCoA'ya dönüşmesidir. Bunun için, AsetilCoA Karboksilaz enzimi katalizörlüğünde, AsetilCoA ve CO_2'den MalonilCoA oluşmaktadır. Burada, yağ asidi biyosentezi için, AsetilCoA ile birlikte, NADPH, ATP, $Mn^{+2,}$ CO_2 kaynağı olarak HCO^-_3 (Bikarbonat) vebiotin gereklidir. Bu dönüşüm Şekil 2.4'teformüle edilmiştir [31, 32, 33, 34].

Daha sonra MalonilCoA, ACP (Acyl Carrier Protein) ile reaksiyona girerek MalonilACP'yi oluşturur. Yağ asidinin sentezlenmesinde, ilk aşamada, AsetilCoA'daki bir asetat grubu, enzimdeki sisteine bağlanır ve devamında Malonil-ACP ile birleşerek Asetoasetil-ACP'yi oluşturur.

Daha sonra 3. Karbondaki keto grubu, üç enzimin etkisiyle, indirgenerek 4 karbonlu yeni bir "Acyl" zinciri(Acyl-ACP = Bütiril-ACP) oluşur. Enzimin katalizörlüğü sayesinde, bu 4 karbonlu asite (Bütiril-ACP) diğer bir Malonil-ACP molekülünden 2 karbonlu bir birimin eklenmesiyle karbon sayısı arttırılır. Bu işlem, yağ asidi zincirinde 16 veya 18 karbon olacak şekilde devam eder. Oluşacak 16 karbonlu (16:0) ACP'ler yağ asidi sentez sisteminden ayrılırlar. Diğer yandan, sentez sisteminde oluşacak 18 karbonlu ACP (18:0-ACP) molekülleri, desaturaz enzimi tarafından 18:1-ACP'ye dönüştürülür. Bu işlemler, plastitlerde tekrar tekrar gerçekleştiği için, bazı yan ürünler de ortaya çıkar (Şekil 2.5)[35].



Şekil 2.5. Bitki hücrelerindeki plastitlerde gerçekleşen oleik asit sentez döngüsü[35]

2.2.2. Aspirde Yağ İçeriğinin Genetik Kontrolü

Geleneksel aspir yağı yüksek seviyede linoleik asit içerir (>70%) bu özelliği yağlı tohumlu bitkiler arasında eşsiz bir özelliktir. Aspirin yüksek oleik yağ asiti içerdiği gen kaynaklarında tanımlanmıştır. Yüksek oleik içeren yağlar, doymamış yağ seviyesi yüksek olan yağlara göre oksitatif stabilitesi daha iyi olan, kolestrol düşürücü etkisi ile gıda ve gıda dışı kullanımlarda fazla tercih edilmektedir. Yüksek oleik asit içeren aspirin başlangıçta toplam yağ asidinin %64 ile %83'ü arasında oleik asit içerdiği, bunun da tek bir *Ol* lokusunda yer alankısmen çekinik olan

"*ol"* allelleri tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. *Ol* alleli taşıyan yabani tip aspir bitkisinde %10 ile %15 oleik asit üretilirken aynı lokusta yer alan bir diğer allel olan ol^1in homozigot olduğu koşullarda %35 ile %50 arasında oleik üretilmektedir[36]. Fernandez-Martinez ve arkadaşları [37] aspir gen kaynaklarının daha önce bildirdiğinden daha fazla (%86-91) oleik asit içerdiğini tespit etmiştir.Hamdan ve arkadaşları[38] resesif *ol* allelleri tarafından üretilen yüksek oleik asit miktarının, modifiye genler ile birarada yer aldığında oleik asit içeriği üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Modifiye genler ile *Ol* allelleri tarafından üretilenoleik asit içeriğinin belirlenen miktarların üstüne çıkarılabileceği daha önce Knowles tarafından önerilmişti [36]. Hamdan ve arkadaşları[38]; modifiye genlerin,*ol* allelleri taşıyan gen kaynaklarında beklenen seviyenin altında üretilen oleik asit içeriğindeki etkisini de tanımlamıştır.Modifiye genlerinoleik asit içeriği üzerindekiolumsuz etkinin aynısının ayçiçeğinde de görüldüğü bildirilmiştir [36].

Yağ asitlerindeki biyosentetik çalışmalarda, mikrozomal enzim oleoil-fosfatidilkolin desatüraz (FAD2), oleik asitten (18:1) linoleik asite (18:2) desatürasyon adımını katalize eder. FAD2 geninin Arabidopsis ve mısır gibi bitkilerde sadece tek bir kopyası olduğu tanımlanırken ayçiçeği, soya fasülyesi ve kanola gibi yağ bitkilerinin genomunda genin birden fazla kopyası bulunmaktadır [36]. Tohuma özgü mikromozal FAD1 (FAD2-1)'in birden fazla kopyasının bulunduğu yağ bitkilerinde tohumdaki oleik asit seviyesinin artışından bu durumun etkili olduğu kanıtlanmıştır [36].

Son dönemlerde aspirde üç farklı FAD2 (FAD2-1, FAD2-2, ve FAD2-3) geni belirlenmiştir [36]. Onlardan, FAD2-1gelişen tohumlarda güçlü bir şekilde bulunur ve ayçiçeğindeki FAD2-1 ile çok benzerlikleri vardır. Buna göre, aspirde FAD2-1 tarafından kodlanan enzim fonksiyonundaki değişiklik, bitkide yüksek oleik asit özelliği ilişkili bir faktör olarak varsayılmaktadır. Diğer yağlı tohum bitkilerinde FAD2 üyeleri mevcut olup, FAD2-1 tohum gelişimi sırasında yüksek anlatım yaparken, FAD2-2 ve FAD2-3 ise düşük anlatım yapmaktadır veya "housekeeping gen"ler gibi ifade düzeyinde değişiklik gözlenmemektedir[36]. Hamdan ve ark.[36] tarafından *Ol* geni sıkıca oleoil-fosfatidilkolin desatüraz FAD2-1 lokusuna bağlantılı olarak haritalanmıştır.

Aspirde yüksek linoleik asit içeriği ise resesif allellerden oluşan tek bir lokus "*Li* tarafından kontrol edilir [36]. Aspirde nükleer erkek kısırlığı (NMS) resesif durumda *Ms* lokusunda belirlenmektedir.

Hamdan ve arkadaşları[40] *Li* lokusunun *Ms* lokusu ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan haritalama çalışmasında IASCA39-1 ve IASCA37-1 markörleri ile *Ms* geni ve *Li* lokusları haritalanmış, IASCA37-1'in *Ms* genine uzaklığı 3.7 cM olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Ms* geni ve *Li* geni arası mesafede11.8 cM olup, iki gen arasında yakın bir bağlanma açık biçimde görülmektedir. FAD2-1 tohumların gelişimindeki linoleik asit sentezinde önemli bir rol oynar ve ayçiçeği, kanola ve soya fasülyesi gibi farklı yağlı tohumlu bitkilerin de gösterdiği gibi mustasyona uğradığı zaman, linoleik asit sentezi bozulur, tohumlarda oleik asidin birikmesine yol açar.

Buna ek olarak, Guan ve arkadaşları [39] yüksek oleik ve standart genotipleri arasında FAD2-1 dizisi karşılaştırırken, yüksek oleik asit aspir genotiplerindeki FAD2- 1 ifadesinin tohum gelişimi sırasında standart (yüksek linoleik) genotipler göre ciddi derecede düşük olduğunu tespit ettiler, bu yazarlar değiştirilmiş protein fonksiyonu ile ilgili olabilecek bir bağlantı buldular. Bu çalışmanın sonucunda, FAD2-1'in aspirdeki rolünün önemli olduuğu, *Ol* geninin temel lokusu olduğu güçlü bir şekilde desteklenmektedir. Yüksek oleik asit içeriğini belirleyen aleller kısmen resesif olduğu için, heterozigot genotipler tam anlamıyla homozigot yabani tiplerden ayırt edilemez.Bu durum yüksek oleik asit özelliği üzerinde durulan melez çalışmalarında *ol* alleli taşıyan bitkileri seçmeyi zorlaştırmaktadır. Markör destekli seleksiyon (MAS) kullanılması, böyle bir sınırlandırmayı aşmakta yardımcı olabilir. Geliştirilen moleküler markörlerelit hatlarda *ol* allellerini melezlemeyi büyük ölçüde destekleyecektir. FAD2-1 ile bağlantılı markörler öngörülebilir fenotipin seçim için uygun olabilmektedir[36].

2.2.3. Oleik Yağ Asidi Miktarini Etkileyen Faktörler

Bitkilerde bulunan oleik yağ asidinin oranı sabit değildir. Oleik yağ asidi, tek genle idare edilen ve resesif (çekinik) bir karakter olup,diğer bir doymamış yağ asidi olan linoleik yağ asidi ile orantılı olarak bulunur. Oleik ve linoleik yağ asitleri arasında güçlü negatif bir ilişki vardır, diğer bir ifadeyle, her ikisi de aynı anda ne düşük miktarda ve ne de yüksek miktarda bulunabilir. Biri artarken diğeri mutlaka azalır veya biri azalırken diğeri mutlaka yükselir [41, 42].

Genetik olarak kontrol edilmesine rağmen, fazlaca çevre koşullarından etkilenmektedir. Diğer bir ifadeyle, oleik yağ asidi, genetik ve çevre şartlarına bağlıdır. Bu etkilenme olumlu yönde olabildiği gibi, olumsuz yönde de olabilir [43].

Ekim Zamanı: Bazı bitkilerde bulunan oleik yağ asidinin ekim zamanı ile değiştiği bilinmektedir. Bazı bitkilerle yapılan ekim zamanı çalışmalarında, oleik yağ asidi oranının etkilendiği belirlenmiştir. Örneğin, aspir bitkisinde ekim tarihi geciktikçe, oleik yağ asidi miktarı azalırken linoleik yağ asidi miktarı artmıştır [44].

Ayçiçeği çeşitleri ile yapılan çalışmalarda, normal yazlık ekimler, tohumlarda oleik yağ asidini yükseltirken, kışlık ekimler tohumlardaki oleik yağ asidinin düşmesine neden olmuştur [45].

Sıcaklık: Oleik yağ asidi içeriği, tane dolum dönemindeki sıcaklıklardan etkilenmektedir. Sıcaklıktaki her 1^{o}C'lik artış, oleik yağ asidi oranında yaklaşık % 2 oranında bir artışa neden olmaktadır [46, 47].

Antalya'da aspir bitkisiyle yapılan bir çalışmada, tane dolum dönemindeki sıcaklık artışların oleik yağ asidi miktarını arttırırken, linoleik yağ asidi miktarı düşmüştür [44]. Dünyanın farklı bölgelerinde aspir bitkisiyle yapılan çalışmalarda, düşük sıcaklıkların oleik yağ asidi oranını azalttığı, yüksek sıcaklıkların ise oleik yağ asidini arttırdığı belirlenmiştir [48].

Avustralya'da kolza bitkisi ile yapılan bir çalışmada, düşük sıcaklıkların kolzada oleik yağ asidi miktarını azalttığı, yüksek sıcaklıkların ise artışa neden olduğu belirlenmiştir [49].

Aynı etkiler ayçiçeği ile yapılan çalışmalarda da ortaya konulmuşolup, özellikle gece sıcaklıklarının yüksek olması durumunda, oleik yağ asidi oranının yüksek olduğunu, düşük sıcaklıklarda ise, oleik yağ asidi miktarının azaldığını ortaya koymuştur. Yüksek sıcaklıklarda oleik yağ asidi miktarını arttırmada esas mekanizma olan yağ asitlerinin birbirine dönüşümünde rol oynayan-özellikle oleik asidin linoleik aside dönüşümünde etkili "Desaturaz"- enzimin faaliyetinin azaldığı, bu nedenle linoleik aside dönüşemeyen oleik yağ asidi miktarının artış gösterdiği tahmin edilmektedir [50].

Yüksek sıcaklığın oleik yağ asidi miktarı üzerine olan etkisi soyada da ortaya konmuştur. Soya bitkisinde iki farklı olgunluk grubundan çeşitlerle yapılan çalışmada, çeşitlerin oleik yağ asidi miktarları, yüksek sıcaklıklarla birlikte artış göstermiştir [51].

Kuraklık: Ayçiçeği çeşitleriyle yapılan çalışmada, bütün çeşitler, kurak şartlardaki yetişme döneminde düşük oranda oleik yağ asidi oluştururken, yağmurlu sezondaki yetişme döneminde ise daha yüksek oranda oleik yağ asidi oluşturmuşlardır. Kurak sezonda, oleik yağ asidindeki bu düşüş % 4-14 arasında değişmiştir [52].

Kolza çeşitleriyle yapılan çalışmada, kurak şartlarda oleik yağ asidi miktarının düşüş gösterdiği belirlenmiştir [53]. Kolza çeşitlerinde, kurak yetişme şartlarında oleik yağ asidi % 3.8 oranında düşüş göstermiştir [54].

Soya çeşitleri ile yapılan çalışmalar, kurak şartlarda oleik yağ asidinin artış gösterdiğini ortaya koymuştur [51, 55]

Güneş Işığı (Solar Radiation): Arjantin'de farklı soya çeşitleri ile yapılan çalışmada, çeşitler hem suni olarak gölgelenmiş hem de direkt güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Direkt güneş ışığı alan, daha fazla güneşe maruz kalan çeşitlerde oleik yağ asidi miktarı daha yüksek bulunmuştur [56].

Hibrit Ayçiçeği çeşitleri ile yapılan çalışmalarda da aynı sonuçlar alınmıştır. Üç hibrit ayçiçeği çeşidinde, artan oranda güneş ışığına maruz kalma, çeşitlerdeki oleik yağ asit miktarını arttırmıştır [57].

Gübreleme: Oleik yağ asidi miktarı ile potasyum ve azot gübrelemesi arasındaki ilişki, pek çok araştırıcılar tarafından açıklanmıştır. Ayçiçeği hibritleriyle yapılan bir araştırmada, potasyum gübrelemesinin oleik yağ asit oranını bir miktar azalttığını buna karşılık linoleik yağ asitinde bir miktar artışa neden olduğu ortaya konmuştur [58].

Başka bir araştırmada ise, yerfıstığı bitkisinde azot gübrelemesinin oleik yağ asidi oranı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, azotlu gübre dozu arttırıldıkça, oleik yağ asidi miktarı da düzenli olarak artış göstermiştir [59]. Kolza bitkisi ile yapılan bir çalışmada, Azot (N) ve Kükürt (S) birlikte uygulandığında, oleik yağ asidi miktarında yükselme olduğu gözlenmiştir [60].

2.2.4 Oleik Yağ Asidinin Kullanım Alanları

Sağlık Alanında: Sağlık amaçlı araştırmalarda, oleik yağ asitleri, araştırıcılar tarafından trigliseritlerden izole edilmektedir. Pekçok uzman, oleik yağ asidi içeren yağların, insan sağlığı açısından tüketilmesi gereken yağlardan olduğu fikrinde birleşmektedir. Oleik yağlar (omega-9), aynı zamanda kötü kolestrol olarak da bilinen, kandaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oranını azaltıp, iyi kolestrol olarak da bilinen yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) konsantrasyonlarını arttırarak toplam kolestrol mikrarının düşmesine yardımcı olmaktadır [61, 62, 63] .

Bunun yanında, oleik tip yağlar (omega-9), kalp hastalıklarının gelişimini yavaşlatmakta, vücutta serbest radikaller olarak da bilinen zararlı maddeleri yakalayan antioksidanların üretimini teşvik etmektedir [34, 61, 62]. Oleik yağ asidi aynı zamanda, özellikle genç erkek çocuklarda görülen ve genetik bir bozukluk olan, sinir sisteminde sinir nöronlarını koruyan ve yalıtımını sağlayan rahatsızlığı olan (MS hastalığı gibi)

Adrenoleukodystrophy (ALD) hastalığında da kullanılmaktadır. Miyelin kılıfı, bir sinir hücresinden diğer bir sinir hücresine bilgileri elektrik akımları şeklinde hızlı ve doğru bir şekilde aktardığı için, miyelin kılıfında oluşacak bir hasar, ALD (düşünme ve hareket etmeyi engelleyen-kasların kullanılamaması) gibi pekçok önemli hastalıkları ortaya çıkaracaktır. Miyelin kılıfı yağ ve proteinlerden oluşmuştur. Oleik yağın özellikle zeytin yağının 4:1 oranında kolza kaynaklı erusik asit ile karışımından elde edilen ve dünyada Lorenzonun yağı olarak da bilinen bir karışım bu hastalığın başlamasına engel olmaktadır [64, 65]. Bu karışım hala genç erkek çocuklarına verilmektedir, ancak bu hastalığın gen tedavisi konusunda çalışmalar devam etmektedir.

Oleik yağ asidi (omega-9), özellikle göğüs kanserinin önlenmesinde etkili bulunmuştur. Bazı göğüs kanseri hastalarında, oleik yağ asidi tüketiminin "HER-2/neu" isimli kanser yapıcı onkogen'in faaliyetlerini engellediği ve kanser riskini azalttığı belirlenmiştir. Oleik asit, aynı zamanda bazı ilaçların etkinliğini arttırmaktadır. Örneğin, göğüs kanserine karşı hedef tedavi olarak uygulanan ve "HER-2/neu" kanser genine karşı çalışan "Herceptin" maddesinin etkinliğini arttırmıştır [34].

Gıda Alanında: Oleik yağ asidinin (omega-9) sağlık açısından değeri gıda üreticileri tarafından anlaşılmış durumdadır. Bu nedenle, bu yağ asidinin salata soslarına eklenmesi, fırınlanmış ürünlere ilave edilmesi ve en önemlisi pek çok hazır gıda ürünlerinde hayvansal yağların, örneğin tereyağı gibi, yerine kullanılması gibi gıda alanında kullanımı mevcuttur.

Oleik yağ asidi, yumurta gibi dağılmayı önleyici, bir arada tutucu gibi özelliğe sahiptir. Bu nedenle, ticari anlamda hazır gıda üretiminde yumurtanın yerine, dağılmayı önleyici ana karışım maddesi olarak oleik yağ asidi kullanılmaktadır. Oleik yağ ile hazırlanacak ekmek, kek ve pasta gibi gıdalar, soğutma ihtiyacı olmadan uzun süre tazeliğini koruyarak tüketime her an hazır olabilmektedir [66, 67].

Oleik yağların yanma dereceleri daha yüksek olduğu için, özellikle

kızartmalarda kullanılmaktadır. Yanma derecesinin yüksek olması, kızartma yağının renk değişimi olmadan daha uzun süreli kullanımına imkan vermektedir. Bu değer normal bir ayçiçeği yağı için 180-190 ^{o}C iken, yüksek oleik yağ asidi içeren herhangi bir yağda 210 ^{o}C ve üzerindedir [66, 68, 69]. Örneğin, diğer tip yağlarda kızartma yapılırken, 3-4 kızartma sonrası yağda renk değişimleri olurken ve değiştirmek gerekirken, oleik tip yağlarda fazladan birkaç kızartma işlemi daha yapılabilmekte ve ancak 5-6 kızartma işleminden sonra değişim gerekmektedir.

Oleik yağ asidi yüksek sıcaklıklarda yağın oksitlenerek bozulmasına karşı dayanıklılığını arttırmaktadır. Bu nedenle, gıda sanayiinde özellikle konserve gıda üretiminde katkı maddesi olarak ta kullanılmaktadır.

Oleik yağ asidi (omega-9) ayrıca, gıdalarda küf mantarına karşı koruyucu olarak da kullanılmaktadır. Oleik yağ asidinin buradaki görevi, saprofit olarak yaşayan pek çok küf mantarı ve ekmek mayası mantarı, Saccharomycescerevisiae'nin gıdalarda bozulmalara neden olmasına engel olmaktır. Özellikle, çabuk bozulabilecek gıdalarda, örneğin salçalarda, salçanın üstünü örtecek kadar oleik yağ ilave etmek bozulmaya neden olabilecek mantarların (özellikle küf mantarları) üremesini ve gelişmesini belirli bir süre önlemektedir [70].

Kozmetik Alanında: Oleik yağ asidi günümüzde pek çok kozmetik firması tarafından yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kullanımın ana gayesi, oleik yağ asidinin çok etkili bir nemlendirici olmasıdır. Cilt nemlendirici kozmetik ürünlerinde ana madde olarak yer almaktadır. Cilt besleyici özelliği nedeniyle, kozmetik firmaları tarafından losyon ve sabunlara ilave edilmiştir. Normal losyon ve kremler cilt üzerinde kalırken, oleik yağ asidi (omega-9) içeren losyon ve kremler ciltte hızla emilerek daha derinlere inmekte ve daha uzun süre etkisini sürdürdüğünden tatmin edici sonuçlar vermektedir. Oleik yağ asidi, şampuanlarda, rujlarda, saç bakım ürünlerinde, tropikal kremlerde, bronzlaşma ürünlerinde ve temizlik ürünlerinde kullanılmıştır [71]. Oleik yağ asidi içeren zeytinyağının

yüzyıllardır İtalya ve Yunanistan'da cilt problemlerinde kullanılıyor olması, oleik yağ asidinin kozmetik alanında önemli bir yere sahip olduğunun en güzel bir örneğidir [71, 72].

Böceklerin Dünyasında: Bal arıları ve karıncaların da dahil olduğu pek çok böcek grubunda, ölmüş ve çürümeye başlamış bireyler oleik asit salgılamaya başlar. Feromon olarak bilinen ve bir çeşit hormon olan bu madde ancak koku ile algılanabilmektedir. Böcek kolonileri arasında, yaklaşan bir tehlikeyi veya ölüm olayını birbirlerine haber vermek için kullanılan bir olaydır.

Bir bölgede, eğer bir böcek yediği bir şeyden veya başka bir tehlikeden ölmüş ise, salgıladığı bu oleik asit içerikli feromon, diğer böcekler tarafından o bölgeden uzak durmak için bir uyarı olarak algılanmaktadır. Bu olay, eğer bir arı kovanı içerisinde meydana gelmiş ise, bu kokuyu alan diğer arılar, ölmüş arıları kovan dışına taşımaktadırlar. Bu nedenle, oleik asit, genellikle "Ölümün Kokusu" olarak da adlandırılmaktadır [72].

2.3. Aspirle İlgili Yapılan Çalışmalar

Aspir bitkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan tez konusu ile ilgili olduğu düşünülen çalışmaların bazıları aşağıda verilmiştir.

Röbbelen ve arkadaşları [73] diğer yağ bitkilerinde de olduğu gibi, serin bölgelerde yetiştirilen aspir bitkilerinde linoleik asidin, sıcak bölgelerde yetiştirilen aspir bitkilerinde ise oleik asidin daha fazla sentezlendiğini, sıcaklık artışları linoleik asit aleyhine oleik asit sentezinin teşvik edildiğini bildirmişlerdir.

Samancı ve arkadaşları [74], üç farklı ekim zamanının (25 Nisan, 5 Mayıs ve 15 Mayıs) üç aspir çeşidinde (Yenice 5-38, Dinçer 5-118 ve 5-154) yağ oranı, yağ asitleri kompozisyonu oleik-linoleik asit oranı (O/L) üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürüttükleri araştırma sonuçlarına göre aspir çeşitlerinin ve farklı ekim zamanlarının yağ oranı ve palmitik ve stearik asit

üzerine etkisi önemsiz, oleik asit üzerine etkisini önemli bulmuşlardır. Geç ekimlere doğru oleik asit oranı düşmüş, linoleik asit oranı ise yükselmiştir. Palmitik ve strearik oranları her üç çeşitte de geç ekimlere doğru azaldığını, O/L oranın geç ekimlere doğru düştüğünü bildirmişlerdir.

Armah-Agyeman ve arkadaşları [75], dünyada yüksek oranlarda linoleik asit içeren aspir çeşitlerinin yaygın olduğunu, ancak son yıllarda linoleik asit tipinden başka özellikle zeytinyağı gibi yüksek oleik asit tipi aspir çeşitlerinin geliştirilmesine çalışıldığını, nihayet ABD' de yüksek linoleik asit içeren çeşitler yanında, yüksek oleik asit içeren aspir çeşitlerinin de geliştirildiğini bildirmişlerdir.

Aşkın [76], doğadan alınan yabani aspir (*Carthamus persicus* Wild) bitkisinin çiçekten tohuma doğru gelişim peryodu takip edilerek yağ asidi bileşimindeki değişikliklerin incelendiği araştırma sonucunda, numunelerinde başlıca yağ asidinin linoleik asit olduğunu, bu yağ asidini sırasıyla palmitik, linolenik, oleik ve stearik asitin izlediğini saptamıştır.

2.3.1. Marköre Dayalı Seleksiyon (MAS)

Islah yoluyla istenilen karakterlerin aktarılması, türler arası melezlemelerle gerçekleştirilir ve yeni bir çeşitin geliştirilmesi uzun zaman alan emek yoğun bir süreçtir [77]. Önemli agronomik karakterleri taşıyan yabani türlerden ıslah materyallerinin geliştirilmesi, bu karakterlerin bulunduğu lokusla bağlantı gösteren moleküler markörlerin belirlenmesi ile hız kazanmıştır. Bu markörlerin ıslah programlarında istenen karakteri taşıyan bireylerin seçiminde kullanılması, diğer bir deyişle MAS, yeni çeşit geliştirilmesi çalışmalarında önemli avantajlar sunar [78].

Moleküler markırlar, bir bireyin genomundaki bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasını temsil etmektedir ve bireyler arasındaki DNA dizi farklılıklarının (polimorfik bölgelerin) saptanması prensibine dayanmaktadır. Islah çalışmalarında kullanılacak MAS sistemlerinin; yüksek düzeyde polimorfizmi belirleyebilmesi, kodominant

karakter taşıması, tekrarlanabilir ve teknik olarak kolay uygulanır olması son derece önemlidir [79].

Moleküler markörler; protein markörler(izoenzimler) ve DNA markörler olmak üzere ikiye ayrılır. Genetik düzeydeki farklılıklar protein düzeyinde ya da DNA düzeyinde araştırılabilir. Önceleri farklılıklar daha çok protein düzeyinde ele alınmıştır fakat günümüzde daha çok DNA düzeyinde çalışılmaktadır.

Protein markörler (izoenzimler) morfolojik karakterlerle kıyaslandığında çok daha etkili sonuç vermelerine karşılık; sıcaklık, stres koşulları, hastalık vb. faktörlerden etkilenmeleri ile etkili oldukları yer ve mevsimsel değişimlere göre farklılık göstermeleri nedeniyle kullanım alanlarını sınırlanmaktadır. İzoenzimler; kodominant özelliği, kolay uygulanabilir ve maliyetinin düşük olması ile sık kullanılan tekniklerden olmasına karşın; tekniğe uygun enzimlerin az sayıda olması, taze bitki dokusuna ihtiyaç duyulması ve ekolojik şartlardan etkilenmeleri önemli olumsuz yanlarıdır.

DNA markörleri; DNA üzerinde belli bölgeleri hedef alarak, degişik bireylerin DNA'nın incelenen bölgesinde farklılık gösterip göstermediğini ortaya çıkaran markörlerdir. Hibridizasyon temeline bağlı yöntemler, RFLP tekniği (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) dayalı teknikler olarak ikiye ayrılır.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) belli bir DNA dizisinin çoğaltılması amacıyla uygulanan bir tüpte test yöntemidir. Bakteriyel, viral, bitkisel veya hayvansal herhangi bir kaynaktan gelen DNA dizileri PCR ile çoğaltılabilir. PCR'a dayalı teknikler; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences),SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) dır[80].

Tarımsal karakterlere özgün moleküler markör geliştirilme araştırmaları diğer yağlı tohumlu bitkilerin aksine aspirde az olmuştur. Aspirde moleküler

markörlerin kullanılması esas olarak; genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi [81] ve *Carthamus* cinsinin taksonomisi üzerine odaklanmıştır [15]. Yazdi-Samadi ve ark. [81] aspir katılımındaki değişiklikleri tespit etmek için RAPD markör kullanmışlardır. Ayrıca Ravikumar ve arkadaşları (2005) RAPD markörler kullanarak potansiyel mutantlar arasındaki polimorfizmleri araştırmışlardır. Sehgal ve Raina [82] Hint çeşitleri üzerindeki değişimi değerlendirmek için RAPD ile birlikte ISSR ve AFLP markörlerini birlikte kullanmışlardır. Son yıllarda; Johnson ve ark. [83], dünya aspir koleksiyonundaki genetik mesafeleri incelemek için AFLP markörleri kullanmış, Chapman ve ark.[15], ayçiçeğinde korunmuş dizilere dayanan genel markörlerdan bir dizi geliştirmiş, marul ve Arabidopsisde karşılaştırmalı haritalama ve filogenetik çalışmaları Asteraceae'da yürütmüş, bazılarını başarlı bir şekilde aspirde geniş olarak açıklamışlardır. Aspir ıslahında kulanılmak üzere moleküler markör geliştirme çalışması Hamdan ve arkadaşlarına [40] kadar hiçbir araştırmada yapılmamıştır. Bu grubun çalışmalarında SCAR markörler; yüksek linolenik asit içeriği, nükleer erkek kısırlık, hydroxysafflor sarı A birikimi ve yüksek gama tokoferol içeriğini tespiti için, sırasıyla *Li*, *MS*, *HSya* ve *Tph2* genlerine bağlantılı olarak geliştirilmiştir [40]. Aspirdeki SSR ve RFLP markörlerindeki son gelişmeler ile [15, 90, 92] bu türün ilk genomik bağlantı haritası [95] için genomik çalışmalara temel oluşturulmuş, aspir ıslahında kullanılabilecek önemli miktarda dizi bazlı aday DNA moleküler markörleri sağlanmıştır.

Tez çalışmasında SCAR markör kullanılmıştır. Bu markörler bir gen veya özellikle ilişkili genomun belirli bir bölgesinden geliştirilen dominant ya da kodominant markörlerdir, çoğunlukla genomda tek bir bölgeden kaynaklanmaktadırlar [80].

2.3.2. Moleküler Çalışmalar Aspirde

Aspir ıslahı için moleküler yaklaşımlar oldukça sınırlıdır.Moleküler ıslah için gerekli olan en önemli bileşenlerden biri ıslahın amacına uygun karakterizasyonu yapacakmoleküler markörlerin belirlenmesidir.Aspirdeki moleküler markörlerin çoğu RAPD, ISSRs,

AFLPdir.Bu markılar, bitkinin genom dizi bilgisi bulunmadığı içindizi bilgisine ihtiyaç duyulmayanbu tip markörlertercih edilmiştir. Bu türün genetik çeşitliliğini değerlendirmek için temel olarak kullanılmaktadırlar [81,82,83].

Basit dizi tekrarları (SSR) ya da mikrosatalit markırlar ökaryotik genomlarda bol miktarda olan basit nükleotid tekrarlarından oluşur [84]. Yüksek derecede polimorfizm içermeleri, tekrarlanabilir ve belli bir lokusu işaretleyebilmeleri sebebi ile sayısız bitki türünde genetik haritalama ve diğer genomik uygulamalar için tercih edilen markırlardır [85].

SSR markırları geliştirmenin ilk maliyeti nispeten yüksek olsa da, birkez geliştirildikten sonra PCR dayalı olan bu markırlar düşük maliyetlidirler. Ayrıca;SSR markır geliştirici yötemler ve SSR taraması yapılabilecek zenginleştirilmiş kütüphanelerinin oluşturulması SSR geliştirme süresini ve maliyetini önemli ölçüde düşürebilir [86]. Son zamanlarda bir takım araştırma gruplarıaspirdeSSR markırın moleküler ıslahdadeğerli bir araç olarak geliştirilmesinin gerekliliğini kabul etmiştir.

Chapman ve arkadaşları [87] EST (Expressed sequence taq) koleksiyonundanelde edilen 104 SSR markörünübu türün popülasyon genetiği analizleri için kullanmışlardır[83].

Naresh ve arkadaşaları [89] aspir melezlerinin tanımlanmasında kullanılmak üzere beşayrı EST-SSR markırın kullanılabilir olduğunu yayınlamıştır. Buna ek olarak; Mayerhofer ve arkadaşları[90] bugüne kadar aspir için en yüksek SSR koleksiyonu (1000'den fazla) gelişimini bildirmiş, başlıca genetik bağlantı analizini başlatmışlardır. Bu yazarlar 153 polimorfik EST-SSR ve 32 polimorfik SSR markörünü aspir genomik kütüphanesinde eşleştirmişler, tanımlamışlar ve bunları Carthamus içindeki türlerin filogenetik analizi için başarıyla kullanmışlardır [91]. Düzgün bir genetik harita elde edebilmek için aspirde artan markır yoğunluğuna ihtiyaç vardır [92].

Yağ bitkilerinde olduğu gibi aspireden elde edilen yağın kalitesini ve besin değerini, yağ asitleri kompozisyonu belirlemektedir. Yüksek oleik asit içeren bitkisel yağlar yemeklik yağ piyasasında doymuş yağlara oranla oksidatif etkisinin sabitliği ve kolestrol düşürücü özelliği ile giderek daha çok tercih edilmektedir [93]. Ayrıca yüksek oleik yağlar sanayide farklı kullanım alanlarına sahiptir [94, 95].

Aspir yağı, genel olarak toplam yağ asitlerinin % 70' den fazlası linoleik asit olanyüksek doymamış yağ düzeyi ile karakterize edilmektedir [96]. Aspir genetik kaynaklarından temin edilen tohumlar yetiştirilerek yüksek oleik yağ asit içeriği olan çeşitler başarıyla saptanmıştır [97, 98, 99].

Başlangıçta yüksek oleik yağ asitli aspirin içeriğinin toplam yağ asitlerinin %63- 84 değiştiği, kısmen çekinik allelle*ol* tarafından tek bir lokus olan *Ol*tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir [100]. Yabani tip aspir bitlilerinin *Ol* allerine sahip bireylerde % 10-15 kıyasla bir diğer farklı allel olan ol^1 aynı lokusta homozigot durumda taşıyan bireylerde %35-50 arasında oleik üretmiştir [100].

Knowles [101], büyük *Ol* lokusu dışında, aspirde ilk kez yüksek oleik asit oluşumunu etkileyen modifiye genlerin olasılığını varsaymıştır. Yazar özellikle, gözlenen transgresif özellikli yüksek oleik asit değerlerini bazı melezlerde bir veya daha fazla modifiye genin varlığı ile açıklanabileceğini önermiştir. Modifiye genler, pekiştirmek veya büyük bir genin etkisini azaltabilmek dışında bilinen bir etkiye sahip olmayan genler olarak tanımlanmıştır [102]. Buna rağmen, aspirde bu genlerin varlığı ve etkileri şimdiye kadar araştırılmamıştır. Fernandez-Martinez ve arkadaşları tarafından [103] aspirde yüksek oleik asit içeriğine (%86-91) sahip çeşitler raporedilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal ve Melezleme Çalışmaları

Tez çalışmasına, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen aspir ıslah çalışmaları kapsamında geliştirilen F_7 kademesindeki hatlar kullanılarak 2014 yılının Nisan ayında araştırma arazisine aspir bitkilerinin ekimi ile başlanmıştır. Melez çalışmalarının daha uzun süre yapılabilmesi amacı ile bitkiler 20 şer gün aralıkla 3 farklı dönemde ekilmiştir.

1.dönem ekim: 09.04.2014

2. dönem ekim: 29.04.2014

3. dönem ekim: 13.05.2014

Ekimi yapılacak materyal belirlenirken yüksek ve düşük oleik yağ asidi olduğu belli olan 6 hatla 5 farklı melez kombinasyonu yapılmış, herhangi bir aksilik olması durumunda melez bitki sayısı garanti altına alınmıştır.

Tablo 3.1. Melezde ana olarak seçilen bitkiler

Hat İsimleri	**Dikenlilik**	**Çiçek Rengi**	**Oleik Oranı**
F_7A-L/**11**	dikensiz	turuncu	düşük oleik
F_7A-L/**20**	dikenli	beyaz	düşük oleik
F_7A-O/**6**	dikenli	beyaz	yüksek oleik

Tablo 3.2. Melezde baba olarak seçilen bitkiler

Hat İsimleri	**Dikenlilik**	**Çiçek Rengi**	**Oleik Oranı**
F_7A-L/**31**	dikenli	turuncu	düşük oleik
F_7A-O/**19**	dikenli	turuncu	yüksek oleik
F_7A-O/**39**	dikenli	turuncu	yüksek oleik

Melezlenecek bitki hatları yüksek oleik yağ asitli melezler elde edilecek şekilde ayarlanmış; ebeveynlerden biri yüksek oleik yağ asitli hat seçilirken bir diğeri düşük oleik yağ asitli olarak seçilmiştir. Bitkilerin kendilenmiş olmaması, melezlerin garanti olması için de; melez yapılacak hatlarda ana ebeveynler çekinik genetik özellikliler seçilirken, baba ebeveynler baskın genetik özellikli seçilmiştir. Dikensiz analar ile dikenli babalar melezlenerek dikenli melezler, beyaz çiçekli analar ile turuncu çiçekli babalar melezlenerek turuncu çiçekli melezler elde edilmiştir. Melez kombinasyonları için 3 ana 3 baba ile çalışılmıştır.



Şekil 3.1. Aspirde emaskülasyon [104]

Melez çalışmalarında; akşam üzeri tarladan alınan baba bitkiler, polen elde edebilmek için, su dolu bir bardağın içine alınarak, kapalı bir kutuda bir gece bekletilmiştir. Sabah bitkiler kontrol edildiğinde, istenen polen oluşumu gözlenmiştir. Ana olarak seçilen bitkiler de bir gün önceden emaskülasyon yapılarak, tabladaki diğer erkek organlar ortamdan uzaklaştırılarak kendilenme olması engellenmiştir. Kağıt zarfla kapatılarak bir gece beklenmiştir. Ertesi sabah hazırlanmış olan baba bitkinin polenleri ana olarak seçilen bitkiye verilmiştir. Toz verilen bitkiler küçük zarflarla kapatılarak melez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Aspirde toz verme, melez tohumlar [104]

Ağustos 2014'te hasat gerçekleştirilmiş F_1 tohumları elde edilmiştir. Elde edilen melez kombinasyonlarından 20 x 19 melezi ile çalışılmaya karar verilmiş, bu kombinasyondan fazla tohum elde edilmiştir. Elde edilen F_1 tohumları serada saksılara ekilerek yıl kaybetmeden kendilenmiş ve F_2 tohumları elde edilmiştir.

Tablo 3.3. Melez Kombinasyonları

Ana Bitki Hatları	Baba Bitki Hatları	Melez
11	19	Dikenli, yüksek oleik asitli
11	39	Dikenli, yüksek oleik asitli
20	19	Turuncu çiçekli, yüksek oleik asitli
20	39	Turuncu çiçekli, yüksek oleik asitli
6	31	Turuncu çiçekli, yüksek oleik asitli

Ana hat, baba hat, F_1 ve F_2 tohumları 2015 Nisan ayında enstitü arazisine ekilmiştir. Mayıs ayında, DNA izolasyonu yapmak için genç ve sağlıklı bitki yapraklarından numune alınarak -80ºC derin dondurucuda saklanmıştır. Numune alınan bitkiler tek tek etiketlenerek arazide işaretlenmiştir. Ağustos 2015'te hasat gerçekleşmiş, etiketli olan bitkilerin

tohumları yağ analizi yapılmak üzere hazırlanmış ve taneden yağ analizi Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu

Yaprak örneklerinden DNA ekstraksiyon işlemi, i-genomic DNA (iNtRON, kat no:17371) ekstraksiyon mini kitleri kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. DNA ekstraksiyon kitin içinde yer alan protokollerden dondurulmuş yaprak örnekleri için uygun olan Protokol A uygulanmıştır.



Şekil 3.3. Laboratuvar Çalışmaları

-80ºC derin dondurucudan çıkarılan örnekler sıvı azot içine alınarak 2 ml tüplere yerleştirilmiş içlerine demir bilyeler atılmış, sıvı azot ile dondurulan yapraklar öğütücüde (RETSCH MM301) parçalanmıştır.



Şekil 3.4. Doku parçalama

DNA izolasyonu protokolde belirtildiği şekilde 200 mg toz halindeki örnek ile başlanmış, örneklekler 1,5 ml tüplere spatula ile konmuştur. Liziz buffer hazırlamak için; her bir örnek için kit içinde yer alan buffer PG 390µl, enhancer solüsyondan 7µl, proteinaz K'dan 20µl, RNase A'dan 5 µl örnekler üzerine ilave edilerek vortekslenmiştir. Parçalanan yaprak örneklerinden her birine 422µl liziz buffer ilave edilmiş 65 ºC'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından herbir örneğe 100µl PPT buffer ilave edilerek iyice karıştırılmış 5 dakika buzda bekletilmiştir. Buzda bekletildiği 5 dakika içinde her 1 dakikada bir tüpler alt üst edilmiştir. Ardından 13000 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santirfüj edilmiştir.



Şekil 3.5. DNA İzolasyonu

Santirfüj sonunda tüpün üstündeki sıvının 200µl dikkatlice alınarak yeni 1,5µl tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpteki sıvının üzerine 650µl PB buffer eklerenerek, 5-6 defa alt üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır. Tüpten 650 µl alınarak kitin içinde yer alan 2 ml toplama tüplerine aktarılmıştır. 1 dakika 13000 rpm'de santirfüjlenmiştir. Tüpte kolonun altında biriken sıvı atılmış ve 1 dakika 13000 rpm'de santirfüjleme işlemi tekrar edilmiştir. Alt tüpler atılarak kolon yeni 2 ml toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Kolonun üzerine 700µl PWA buffer ilave edilerek 1 dakika 13000 rpm'de santirfüjlenmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı atılarak, kolonun üzerine 700µl PWB buffer ilave edilmiş 1 dakika 13000 rpm'de santirfüjlenmiştir. Altta biriken sıvı atılarak santirfüj işlemi tekrar edilmiştir. Kolon toplama tüplerinden ayrılarak yeni 1,5 ml tüplere alınmış, kolonun üzerine 100µl PE buffer ilave edilmiş oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilmiştir. Son olarak 13000 rpm'de santirfüjlenerek kolondaki DNA'nın 1,5 ml tüpe geçmesi sağlanmıştır. İzolasyondan sonra örnekler Qubit 2.0 Fluorometer ile analiz edilerek izole edilen DNA yoğunluğu belirlenmiştir. Her bir örneğe ait DNA'lar 25 ng/µl olacak şekilde steril distile su ile sulandırılmış ve moleküler markör analizlerinde kullanılmak üzere -20 ºC derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.6. DNA yoğunluk ölçümü

3.3. SCAR Markör Analizleri

Literatürde yapılmış makalelerden yararlanarak aspirde yağ içeriğini kontrol eden *FAD2.1* ve *Ol* genleri ile bağlantılı olduğu bildirilmiş [40]. 8 adet SCAR markör seçilmiştir. Bu SCAR markörlerine ait primerlerin isimleri ve nükleotid dizisi Tablo 3.4.'de verilmiştir. Primerler; mikrosatellite belirleme aracı olan MISA ve primer tasarım programı Primer3 entegrasyonundan oluşan PrimerPro programı ile belirlenmiştir [91].

Tablo 3.4.PCR metodunda kullanılacak primer setleri

SCAR markörler	Primer Adı	Primer dizisi
IASCA 73.1	IASCA 73-F1	5’-GGCACTGAGGGAGATAGATACATA-3’
	IASCA 73-R1	5’-GGCACTGAGGAACCAATAT -3
IASCA 73.2	IASCA 73-F2	5’-GTTTTTTAGTTTCGGATTGG-3’
	IASCA 73–R2	5’-GCAACAGATGCATTATGTCT-3’
IASCA 74.1	IASCA 74–F1	5’-TGCGCCCTTCCTTTAACG -3’
	IASCA 74–R1	5’-GACTGCACACACTCATCTCTCGC -3’
IASCA 74.2	IASCA 74–F2	5’-ACAAGATTTAACCAACAATGGG -3’
	IASCA 74–R2	5’-GGTTTTTTTCGGCAAATGAA -3’
IASCA 37.1	IASCA 37-F1	5’- TCGGACGTGACCACGGAGA-3’
	IASCA 37-R1	5’- TCGGACGTGAGGAAGAAGAC-3’
IASCA 37.2	IASCA 37-F2	5’- GAGAATTGACGCGATTCATG-3’
	IASCA 37-R2	5’- ACGGAGAGTTGCTTTCTTAA-3’
IASCA 39.1	IASCA 39-F1	5’- GAAACACCCCTAAGTAAAAATA -3’
	IASCA 39-R1	5’- GAAACACCCCCTATATGCAT -3’
IASCA 39.2	IASCA 39-F2	5’- AGGTAATAAAGACTTGCAAAGACAG -3’
	IASCA 39-R2	5’- GTCGTTACAACATAAGTGTTTG-3’

3.3.1. PCR Optimizasyonu

Kullanılan bileşenlerin, sıcaklık ve sürenin PCR için optimum koşulları sağlaması, reaksiyonu inhibe edecek bileşenlerin uzaklaştırılması, kontaminasyon riskinin bertaraf edilmesi, elde edilen sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğiiçin önemlidir. Verimli sonuç almak için dNTP, Mg^{++}, DNA polimeraz enzimi, primerler ve tampon çözeltisi konsantrasyonlarının iyi ayarlanmasının yanında, primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve döngü sayıları için gerekli optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra örneklerin çalışılmasına geçilmiştir.

3.3.2. PCR Karışımı

Çalışmada tüm PCR' lar için, Invitrogen gen marka Platinun Taq DNA Polymerase enzim kullanılmıştır. Hazırlanan karışımın içeriği; 5 U/µl *Taq* DNA polimeraz, 10µM Primer F, 10µM Primer R, 50 mM $MgCl_2$, 10X PCR Buffer, 10mM dNTP ve H_20 şeklindedir. Karışıma son olarak da örnek DNA eklenmiştir. PCR karışımını oluşturan bileşenler ve son konsantrasyonları Tablo 3.5' te belirtilmiştir.

Tablo 3.5.PCR karışımını oluşturan bileşenler ve son konsantrasyonları

İçerik	**Miktar**
H_20	17,0 µl
10X PCR Buffer	2,5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,9 µl
dNTP (10mM)	0,6 µl
Primer F (10µM)	0,9 µl
Primer R (10µM)	0,9 µl
Platinun Taq Polimeraz (5U/µl)	0,2 µl
Örnek DNA (25ng/µl)	2,0µl
Total hacim	**25 µl**

Hazırlanan PCR karışımlarına, kalıp olarak örneklere ait genomik DNA'dan 50'şer ng ilave edilmiştir.

3.3.3. Primerlerin Optimum Bağlanma Sıcaklığının Belirlenmesi

PCR çalışmaları için optimum primer bağlanma sıcaklıklarının bulunması için gradient PCR yapılması gerekmiştir. Her markör için gradient PCR yapılarak optimum sıcaklıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Gradient PCR'da her markörün primerlerinin Tm sıcaklıkları baz alınmış ve Tm değerinin 3-13ºC altındaki değereler primer bağlanma sıcaklığı olarak seçilmiştir. Gerçekleştirilen gradient PCR'lar için kullanılan reaksiyon karışımları, Tablo 3.7'de verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde koşturulup görüntülemesi yapılarak en uygun bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.6. PCR çalışmasında uygulanan PCR koşulu

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 ºC	3 dakika	1
94 ºC	30 saniye	34
Tm değeri-3/13 ºC	45 saniye	
72 ºC	1 dakika	
72 ºC	5 dakika	1

3.4. Yağ Asidi Analizleri

Tezde yer alacan genetik materyalin yağ asit oranı içeriklerinin belirlenmesi için yapılan yağ asidi analizleri, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında mevcut Agilent 6850 marka Gaz kromotografi cihazı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Genetik materyalin yağ asit miktarları (Oleik, Linoleik, Stearik ve Palmitik yağ asidi) belirlenmiştir(Tablo 3.9).

Yağ asitleri analizleri, gaz kromotografi cihazında HT-88 tip kolon kullanılarak, aspir genetik materyalinden alınan asgari 1 g olacak miktarda aspir taneleri parçalanarak, N-Heptan çözeltisiyle muamele edilmiştir. Aspir tohumları soğuk pres makinası kullanılarak yağları çıkarılmıştır. Çıkarılan yağdan 2 damla 13ml'lik şişeye konulmuş, daha sonra şişeye 10 ml n-heptan konularak sonrasında 0.5 ml 2 mol metanollü KoH ilave edilmiştir. Ardından 2-3 dakika vortekslenerek ve en az 1 saat olacak şekilde bekletmeyealınmıştır. Bekletilen tüplerde çökelme olduğundan, tüpleri yavaşça açıp (çalkalamadan) dibe inmeden üzerinden 2ml çözelti çekilip 2 ml'lik viallere aktarılmıştır. Son olarak GC (gaz kromotografi)'ye konularak ölçüm yapılmıştır.(Şekil 3.6 ve Şekil 3.7)





Şekil 3.7. Aspir tanelerinden soğuk pres ile yağ çıkarma



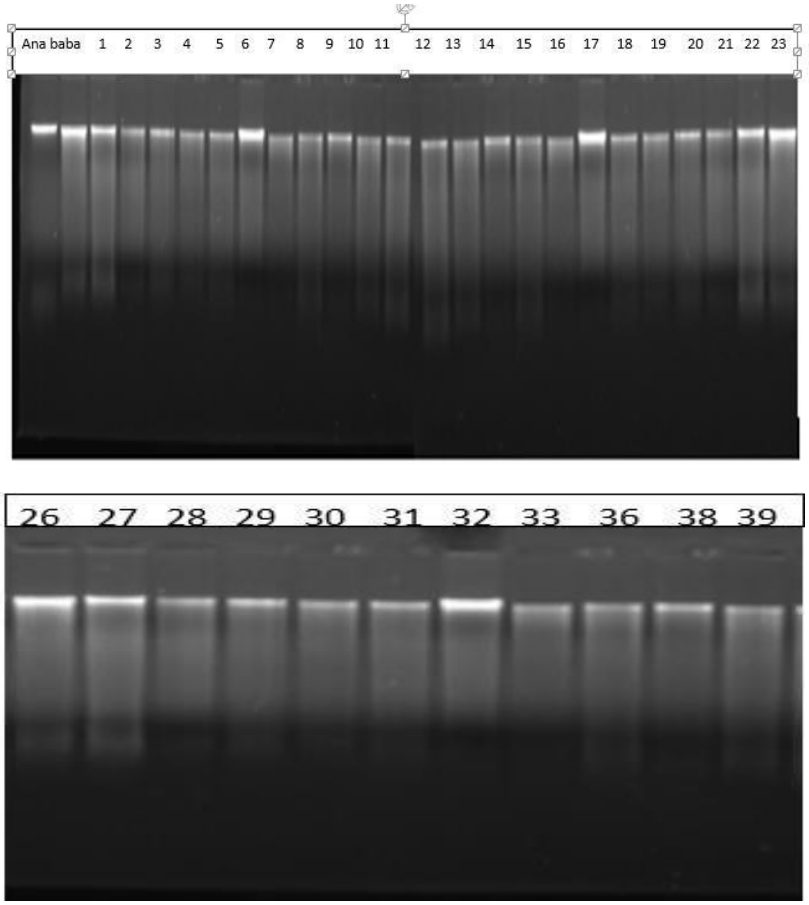
Şekil 3.8. GC de yağ asidi ölçümleri

BÖLÜM 4

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Genomik DNA izolasyonu

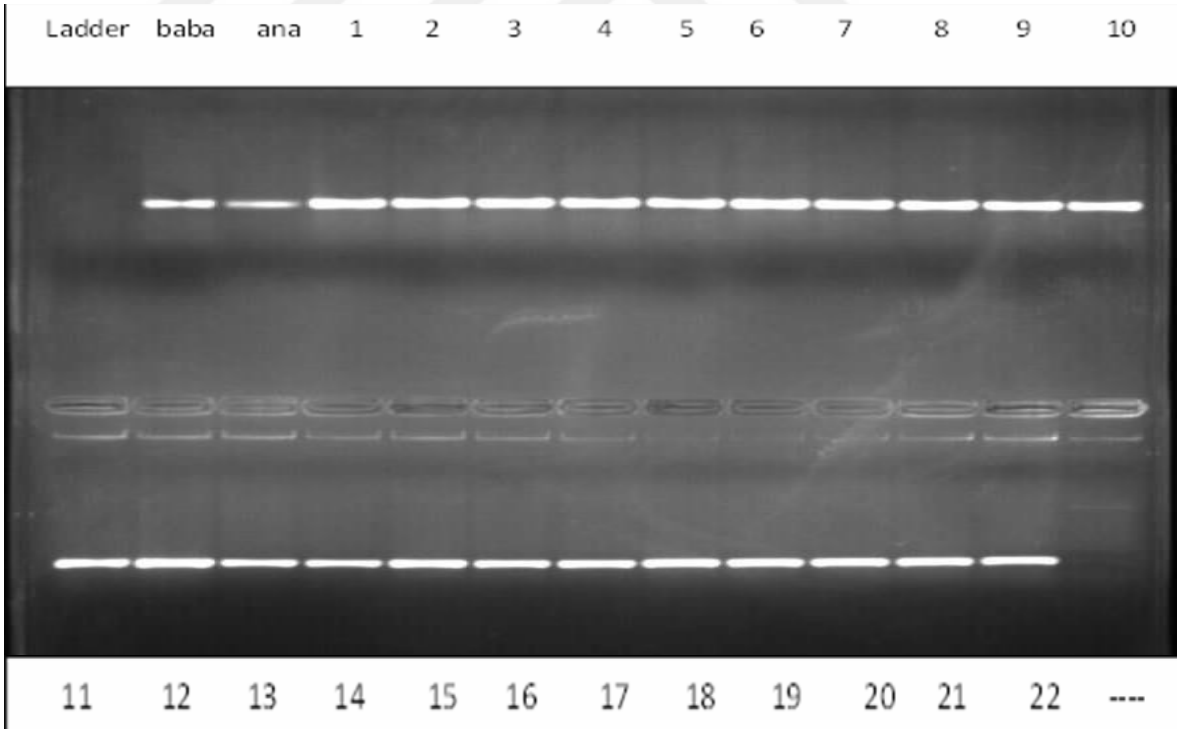
Bitki materyalinin yaprak dokusundan ektrakte edilen genomic DNA'ların kalitesi %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda genomik DNA'ların kalitesinin tezde yapılacak markör analizleri için yeterli ve uygun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



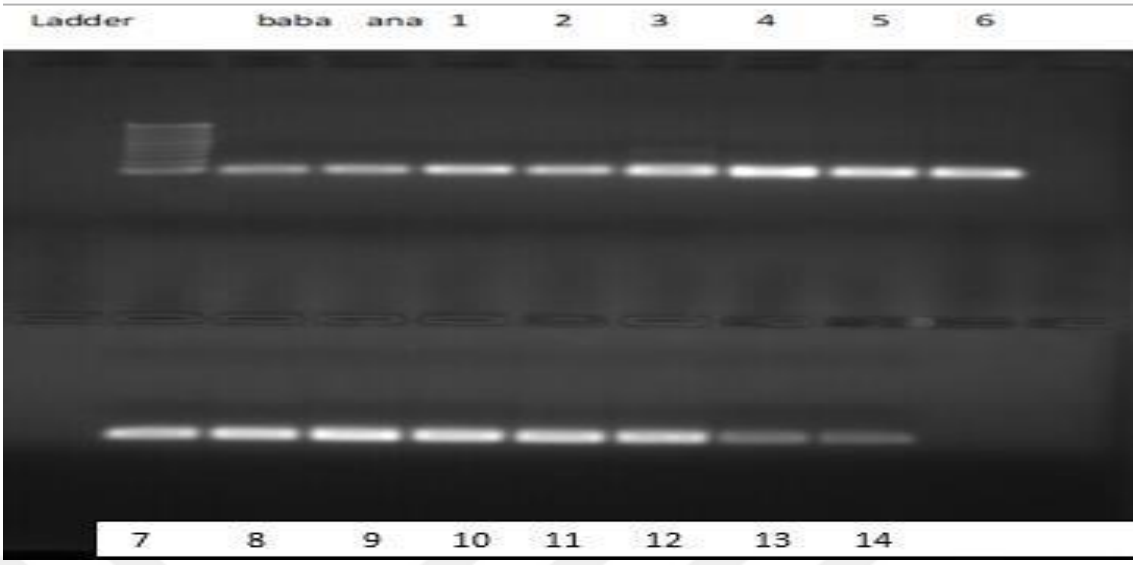
Şekil. 4.1. Aspir geneomik DNA'larının agaroz jel görüntüsü

4.2. Markör Analizleri

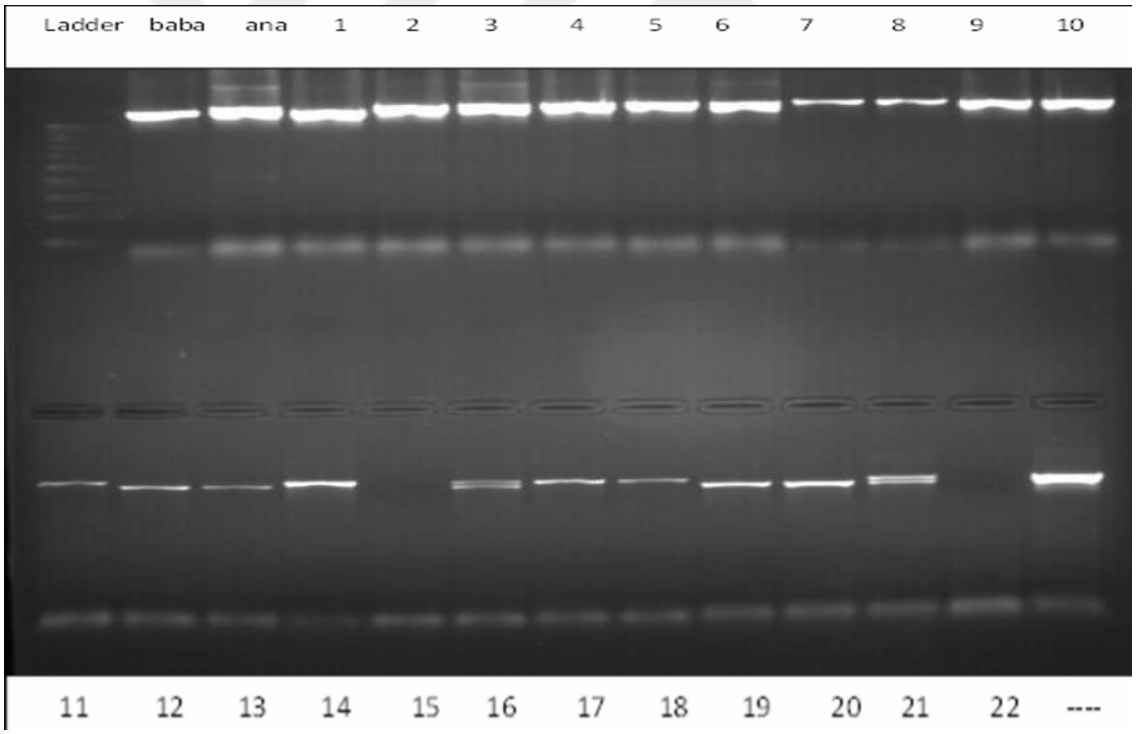
Tez çalışmasında gerçekleştirilen markör analizlerinde her bir markör için elde edilen PCR ürünleri, %2-3'lük agaroz jel elektroforezinde analiz edilerek görüntülenmiştir. Elde edilen polimorfik bant profillerine sahip bireylerde bant profilleri ile yağ aside içeriği karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan 8 SCAR markörü ve bunlardan üretilen PCR ürünlerine ait jel görüntüleri Şekil 4.2- Şekil 4.8'de sunulmuştur. Jel görüntülerinden de görüldüğü gibi kullanılan markörlerden IASCA73.1, IASCA73.2, IASCA37.1, IASCA37.2 ve IASCA39.2 bireyler arasında polimorfik bant üretmiş ancaksadece IASCA73.1 marköründeki bant profillerinin hem anne/baba hemde yüksek/düşük oleikyağ içeriği ile ilişkili olabileceği öngörülmüştür. Tüm bireylerde yağ analizi yapıldıktan sonar tekrar bu markör ile tarama yapılmış ve oleic yağ içeriği ile bağlantılı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



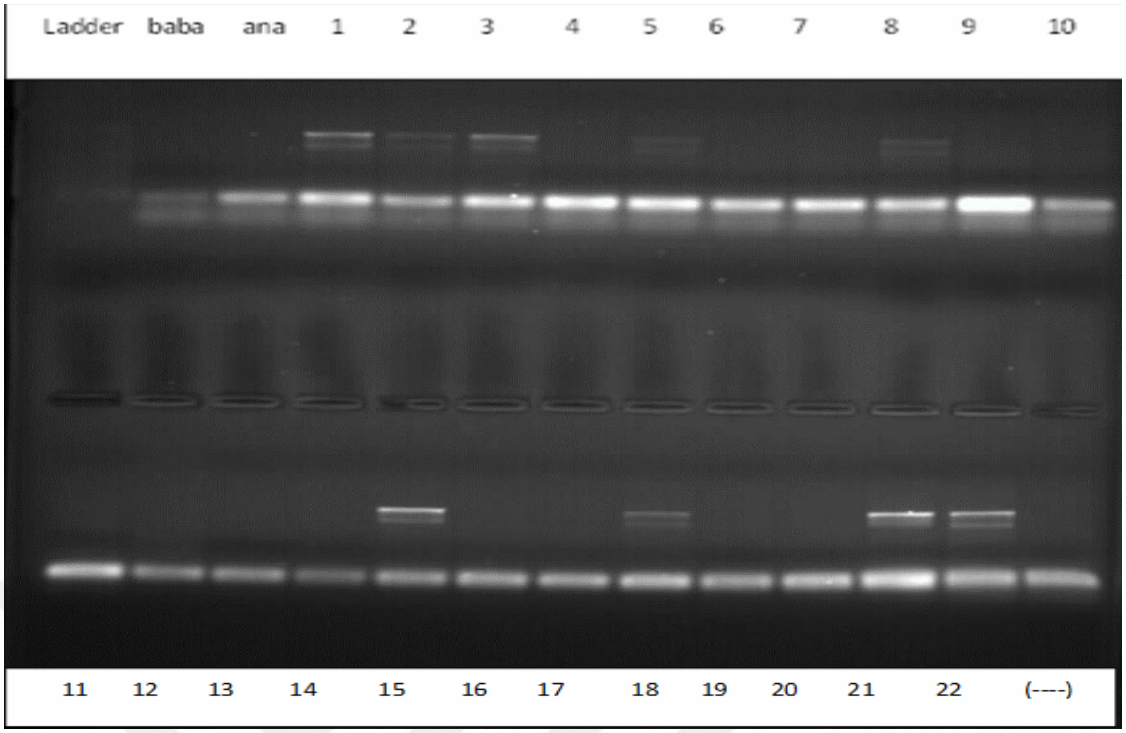
Şekil 4.2. IASCA 74(1) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



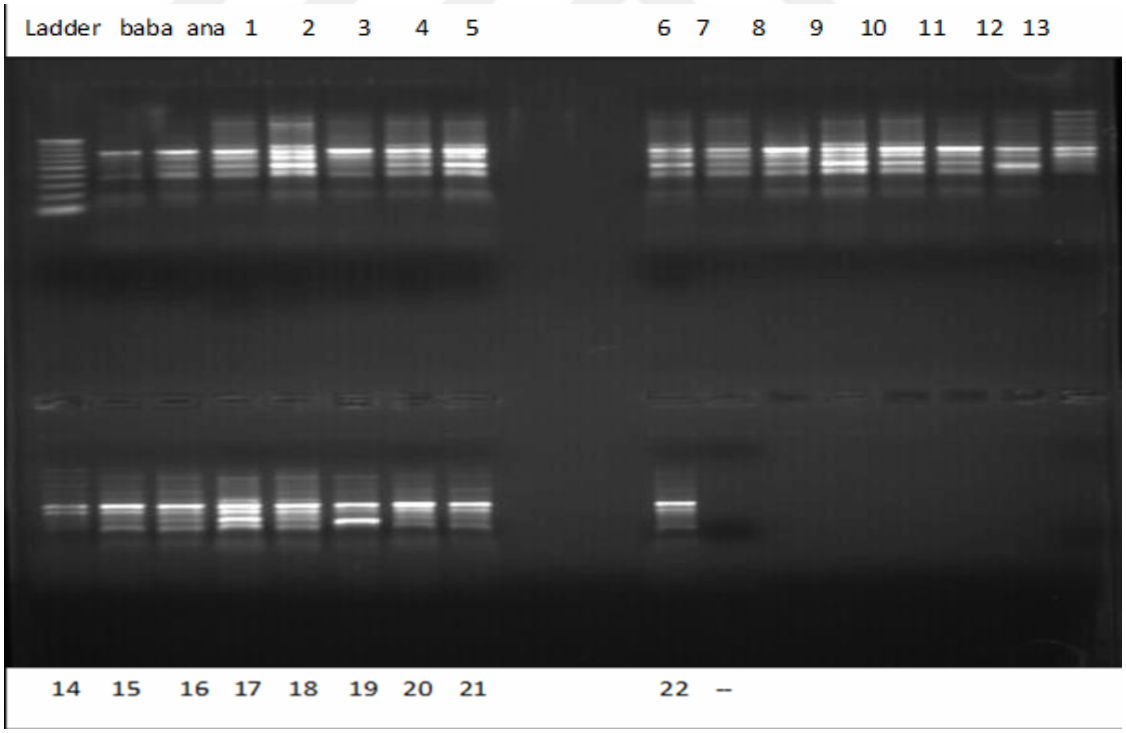
Şekil 4.3.IASCA 74(2) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



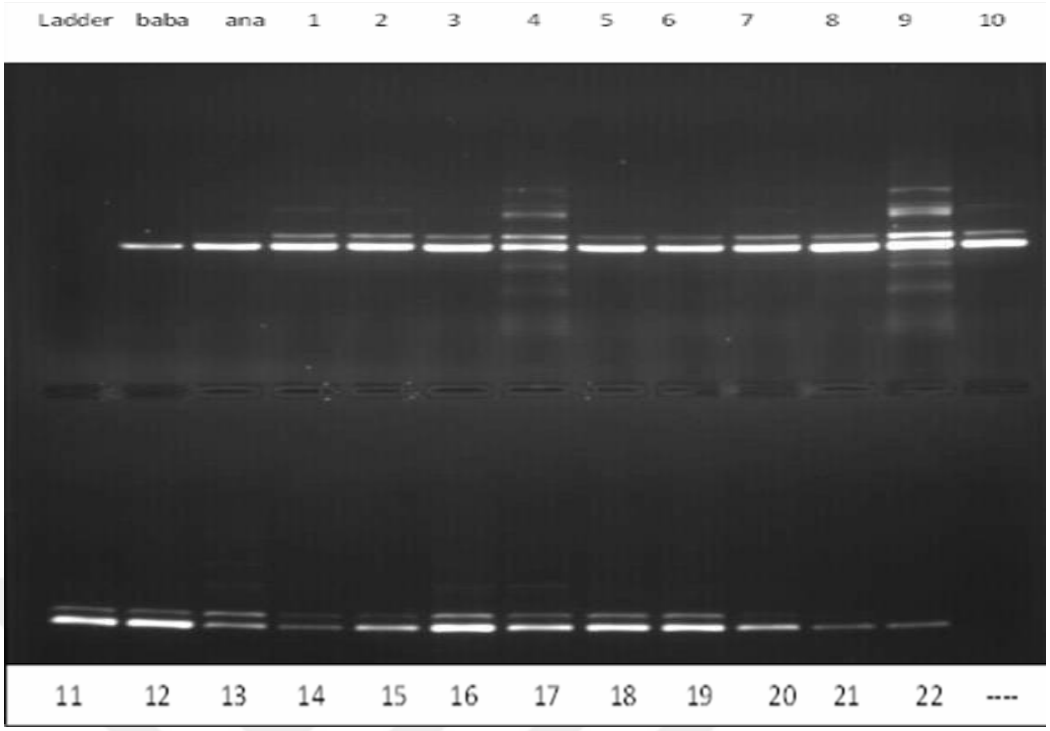
Şekil 4.4. IASCA 73(1) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentler



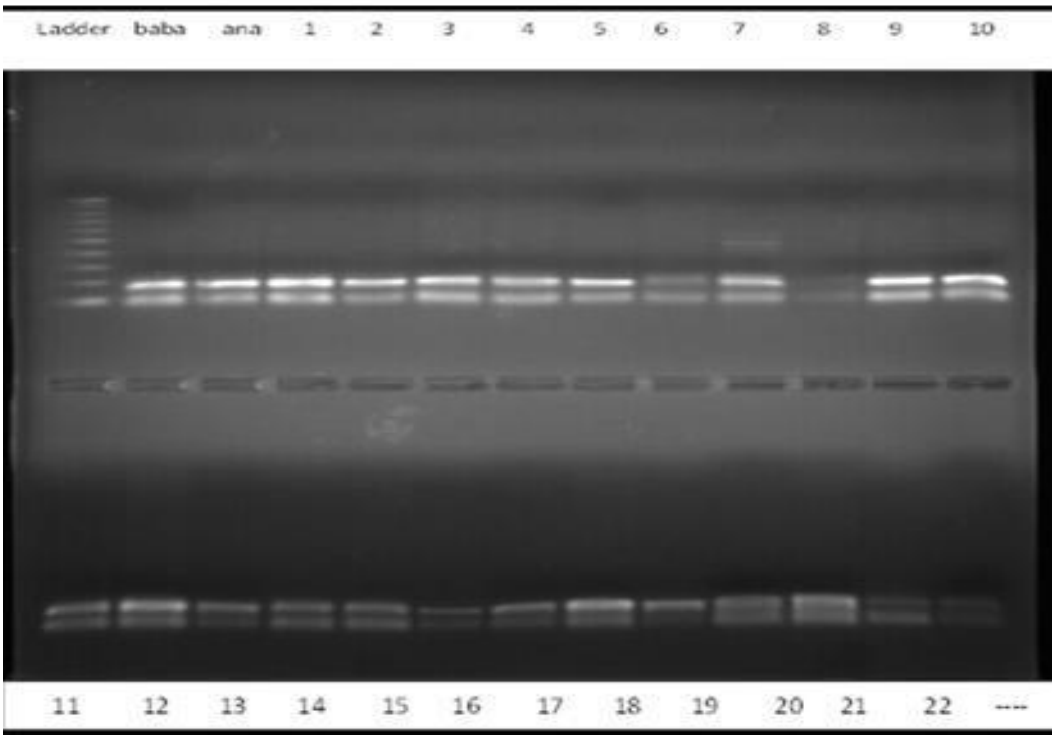
Şekil 4.5. IASCA 73(2) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



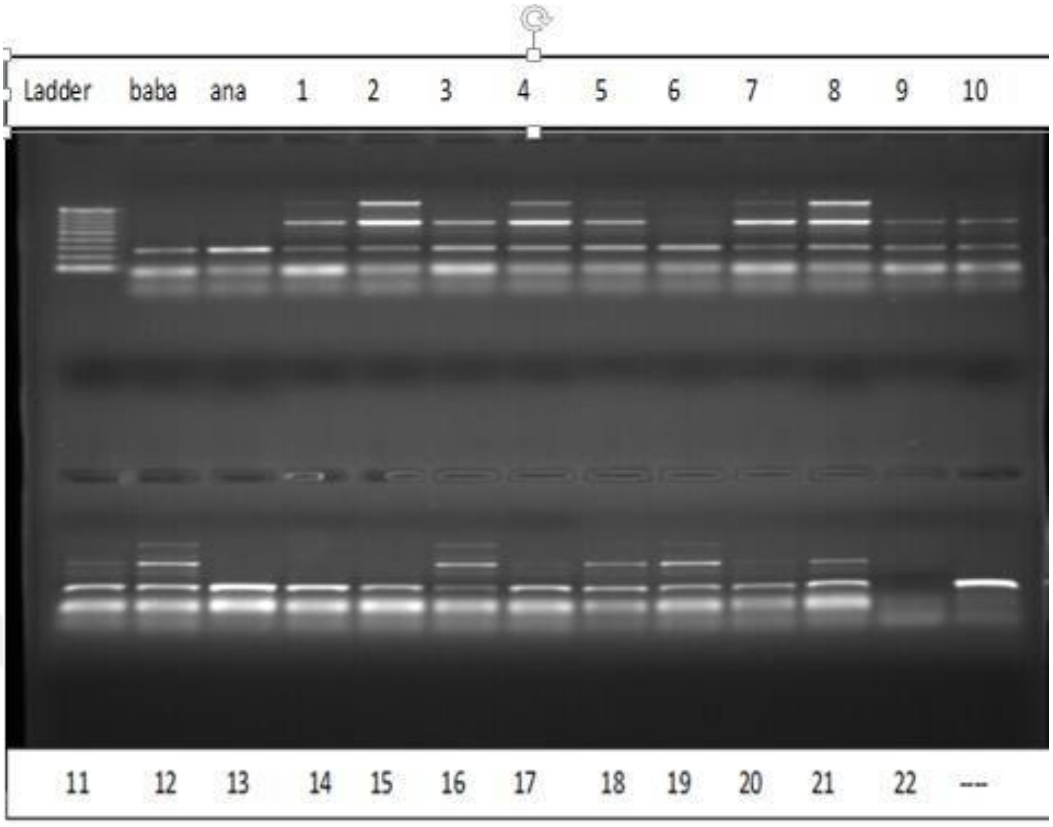
Şekil 4.6. IASCA 37(1) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



Şekil 4.7. IASCA 37(2) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



Şekil 4.8 IASCA 39(1) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri



Şekil 4.9 IASCA 39(2) markörü ile yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentleri

4.3. Yağ Analizleri

Araştırmada kullanılan bitki örneklerinin yağ asitleri sonuçları Tablo 4.1 de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara en yüksek oleik asit oranı %76,3 ile 10 nolu örnekten elde edilmiştir. Aspirde yüksek oleik olarak adlandırması için %70'in üzerinde bir oranında olması gerektiğinden, yapılan analizler sonucunda 7, 9, 10 ve 16 nolu örneklerin yüksek oleik sınıfına girdiği belirlenmiştir. Bu örneklernde 3, 4 ve 6 nolu örneklerinde orta oleik (% 50-70) sınıfında yer aldığı görülmektedir.

Tablo 4. 1 Yağ asidi analiz sonuçları

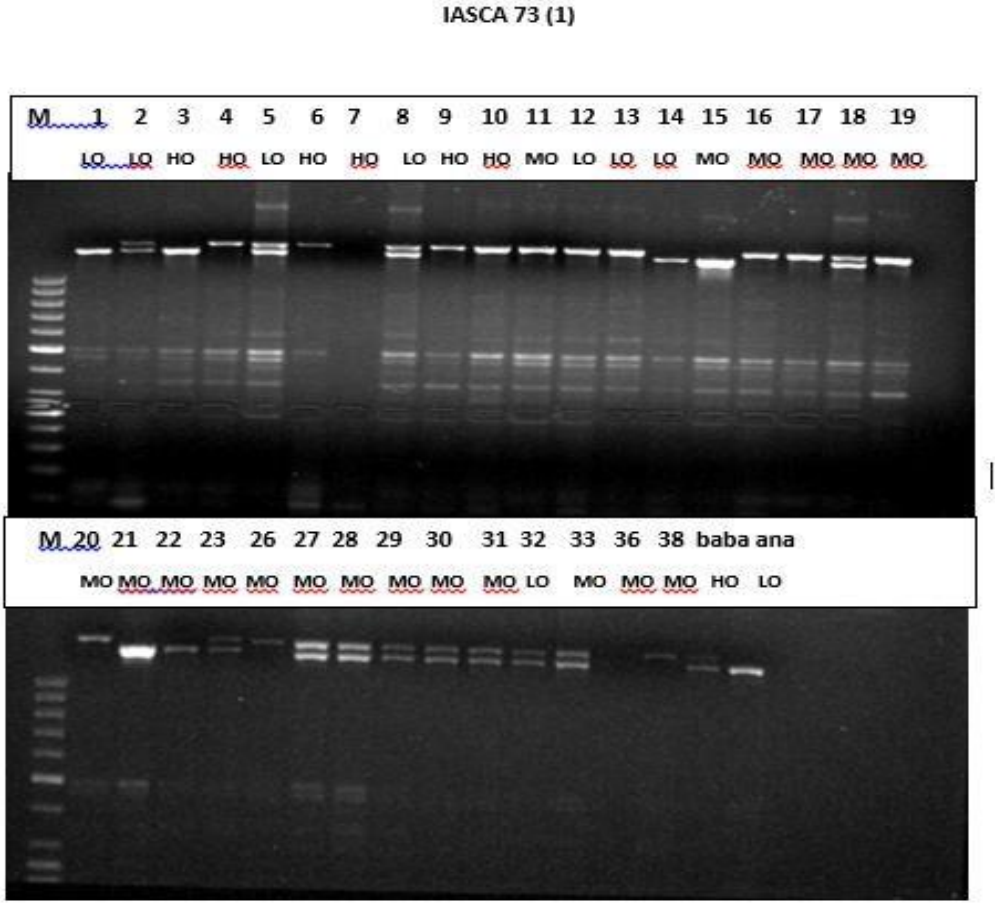
Örnek	Oleik	Linoleik	Stearik	Palmitik
ANA	13,7	76,4	2.0	6,6
BABA	79,4	11,5	1,9	5,6
1	12,1	76,6	2,7	7,6

Örnek	Oleik	Linoleik	Stearik	Palmitik
2	30	60,4	2,1	6,5
3	63,4	28,2	2,1	6,1
4	66,6	24,8	2	5,7
5	15,7	73,7	2,5	7,2
6	63,3	28,1	2	5,7
7	73,5	18,2	2	5,4
8	37,5	53,4	2,5	6,4
9	70,0	21,3	1,8	5,9
10	76,3	14,6	1,9	6
11	34	55,9	2,3	6,8
12	15,8	74,4	2,4	6,6
13	15,5	74,5	2,3	6,8
14	15,1	73,8	2,5	7,4
15	33,4	56,7	2	6,8
16	70,6	20,7	2	5,8
17	35	55,1	2,6	6,5
18	35,5	55,2	2,1	6,3
19	33,2	58,2	2	5,8
20	35,9	54,5	2,1	6,6
21	31	59,2	2,1	6,7
22	35,8	54,9	2,1	6,3
23	30,5	58,9	2,3	6,5
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	32,4	58,3	2	6,4
27	34,4	55,9	2,5	6,3
28	33,2	57	2,5	6,4
29	30,2	55,9	2,4	6,6
30	34,5	55,7	2,2	6,7
31	33,6	56,7	2,3	6,5
32	15,3	74,5	2,4	6,9
33	37,8	52,6	2,2	6,5
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	31,5	59	2	6,3
37	-	-	-	-
38	32,7	56,8	2,5	6,7

SONUÇ

Sunulan tez çalışmasında,yüksek ve düşük oleik yağ asidi içeren aspir genotiplerini birbirinden ayırt edebilecek moleküler markör belirlenmesine çalışılmıştır. Çalışmada yüksek ve düşük oleik yağ asidi içeren iki aspir hattı melezlenmiş veF_2 jenerasyonunda işaretlenen bitkilerin yaprak dokularından DNA izolasyonu yapılmıştır. Literatürde, aspirde yağ içeriğini kontrol eden *FAD2* ve *Ol* genleri ile bağlantılı olarak haritalanmış SCAR markörleri seçilerek bu markörlerle tarama yapılmıştır. Seçilen ebeveyn çeşitler ve bunların melezlenmesinden elde edilen F_2 bitkilerinin yağ içeriği ile moleküler markörlerden elde edilen bant profilleri eşleştirilerek değerlendirilmiş ve ıslahta seleksiyon amaçlı kullanılabilecek bir markör belirlenmeye çalışılmıştır.

Kullanılan 8 SCAR marköründen sadece IASCA73.1 ile üretilen >1000 kb büyüklüğündeki 2 DNA fragmentlerinin aspirdeyüksek oleik yağiçeriği ileilişkili olabileceği öngörülmüştür. Diğer markörler, bireyler arasında polimorfik bant profili üretmekle birlikte elde edilen bant profillerinin teze konu olan karakterle anlamlı bir ilişkisinin bulunmayacağı gözlenmiştir. Çalışmada bitki materyalini oluşturan tüm bireylerde yağ analizi yapıldıktan sonra tekrar IASCA73.1 markörü ile PCR yapılmış ve elde edilen bant profilleri karşılaştırılmıştır. Yağ analizi sonucu %70 ve üstü oleik yağ asidi içeren bireyler yüksek oleik (HO), %50-69 oranında oleik yağ asidi içeren bireyler orta oleik (MO) ve %50'den daha az oleik yağ asidi içeren bireyler ise düşük oleik (LO) olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.9'da da gözleneceği gibi jel fotoğrafı üzerinde bireyler HO, MO ve LO olarak işaretlenmiş ve IASCA73.1 markörünün ürettiği >1000 kb'den büyük 2 DNA fragmentinin yağ içeriği ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda IASCA73.1 markörünün ebeveynlere özgü allelikfarkları belirleyici ancak oleik yağ karakterinden bağımsız ayırıcı bantlar ürettiği belirlenmiştir. Diğer markörler ise bireyler arasında anlamlı herhamgi bir farklılık ortaya koyamamıştır.



Şekil 4.10. Tez çalışmasında kullanılan tüm bireyler linoleik yağ içeriği ile IASCA 73(1) marköründen elde edilen bant profillerinin ilişkisinin değerlendirilmesi. (1-38: F_2 bireyleri, LO: Low oleic, HO: High oleic, MO:Mid oleik)

Tez çalışması sonucunda literatürde rapor edilen aspirde yağ kompozisyonuyla ilişkili *FAD2* ve *Ol* genleri ile bağlantılı olarak sunulan 8 SCAR markörü (IASCA 73.1, IASCA 73.2, IASCA 74.1, IASCA 74.2, IASCA 37.1, IASCA 37.2, IASCA 39.1, IASCA 39.2) tez çalışmasında kullanılan bitki materyali için ayırıcı bulunmamıştır.

TARTIŞMA

Hamdan ve ark. yaptığı çalışmada [36] *Ms* geninin nükleer erkek kısırlığı kontrol ettiği gibi aynı zamanda *Ol* genine 63.8 cM genetik uzaklıkta olduğunu saptanmıştır. Önceki klasik genetik çalışmalarla *Ol* ve *Ms* genleri arasındaki bağ, lokuslar arasındaki genetik mesafe 50cM üzerinde olduğu için belirlenememişti[38] . Hamdan ve arkadaşlarının [40] daha önceki çalışmalarında IASCA-45, IASCA-42 ve IASCA-39 SCAR markörlerinin 31,9-27,4 cM aşağısında *Ms* genini eşleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada; SCAR markörler ile *Ms* geni arasındaki haritalamada iki yeni popülasyonun eşleşmesi kanıtlanmış ve *Ms* genine bağlı dört yeni SSR markörleri (CAT26, CAT83, EL375341 ve ct002) tespit edilmiştir [106]. Erkek steril ya da erkek fertil allel taşıyan hatların MAS kullanılarak belirlenmesi, melezlemelerde verimli çeşitlerin erken çıkarılmasına ve nükleer erkek sterilite ile *Ms* geni kullanılarakgeriye melezleme programlarında soy testi önleyecektir.

Hamdan ve ark.yaptığı çalışmada [36] IASCA 73-2 FAD2 ilişkisi bulunmuştur fakat tezde kullanılan hatlarda markörle gen arasındaki bağlantının krossing overla(parça değiştirme) ile kopmuş ya da uzaklaşmış olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu markörlerin kullanılan hatların ve onlardan üretilen döllerin oleik yağ kompozisyonuyla bağlantılı anlamlı herhangi bir bilgi üretmediği ortaya konmuştur. Bununla birlikte IASCA 73-2 genotiplerin ayrılmasında kodominant özellikte bir markör olduğu *Li* lokusu ile yakın ilişki gösteren *Ms* lokusu ile bağlantılı olabileceği de düşünülmektedir. Çünkü Hamdan ve arkadaşları [40] tarafından yapılan haritalama çalışmasında IASCA39-1 ve IASCA37-1 markörleri ile *M*s ve *Li* lokusları haritalanmış, IASCA37-1'in *Ms* genine uzaklığı 3.7 cM olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Ms* lokusu ve *Li* lokusu arası mesafe de 11.8 cM olup, iki gen arasında yakın bir bağlanma açık biçimde görülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] A. Köse, ***Tarımsal Araştırmalardan Bakış 2015,*** TAGEM, 260, 301-306, (2015).

[2] ***http://www.tuik.gov.tr,*** (2015).

[3] ***http://faostat.fao.org,*** (2015).

[4] Yuan, G., Han Yunzhou, and Dajue, L., ***Safflower germplasm and its exploitation and utilization***, Science Press., pp 344 , (1989).

[5] Knowles, P.F. and Ashri, A., ***Safflower: Carthamus tinctorius (Compositae)***, In Evolution of Crop Plants 2nd edition, Edited by: Smartt J, Simmonds NW. Harlow, UK , Longman 47-50, (1995).

[6] Dajue, L. and Mündel, H.H., ***Safflower***:***Carthamus tinctorius L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops***,7.Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 83 p.,(1996).

[7] Weiss, E.A.,Castor, ***Sesame and Safflower.*** Barnes and Noble, Inc. New York, NY, (1971).

[8] Knowles, P.F.,***Safflower Advances in Agronomy*** 10:289-323, (1958).

[9] Knowles, P.F., ***Centers of plant diversity and conservation of crop germplasm - Safflower.*** Economic Botany23(4):324-329, (1969).

[10] Vilatersana, R., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., and Garnatje, T., ***Generic delimitation and phylogeny of the Carduncellus-Carthamus complex (Asteraceae) based on ITS sequences***. Plant Systematics and Evolution 221:89-105, (2000).

[11] Vilatersana, R., Garnatje, T., Susanna, A., and Garcia-Jacas, ***Taxonomic problems in Carthamus (Asteraceae): RAPD markers and sectional classification***,Botanical Journal of the Linnean Society, 147(3):375-383, (2005).

[12] Sehgal, D., and Raina, S.N., ***Genotyping safflower (Carthamus tinctorius) cultivars by DNA fingerprints,***Euphytica146(1-2):67-76, (2005).

[13] Garnatje, T., Garcia, S., Vilatersana, R., and Valles, J.,***Genome size***

variation in the genus Carthamus (Asteraceae, Cardueae): Systematicimplications and additive changes during allopolyploidization, Annals of Botany, 97(3):461-467, (2006).

[14] McPherson, M.A., Good, A.G., Topinka, A.K.C., and Hall, L.M., ***Theoretical hybridization potential of transgenic safflower (Carthamus tinctorius L.) with weedy relatives in the New World***. Canadian Journal of Plant Science, 84(3):923-934, (2004).

[15] Chapman, M.A and Burke, J.M., ***DNA sequence diversity and the origin of cultivated safflower (Carthamus tinctorius L.; Asteraceae),*** BMC Plant Biology,7:60, (2007).

[16] Hooker, Jackson, ***Characterization and Evaluation of Safflower Germ Plasm***, Geological Publishing House, Beijing, pp.234-235, (1993).

[17] Ashri, A., and Knowles, P.F., ***Cytogenetics ofSafflower (Carthamus L.) species and their hybrids***, Agronomy Journal, 52(1):11-17, (1960).

[18] Khidir, O.M. and P.F. Knowles, ***Cytogenetic studies of Carthamus species (Compositae) with 32 pairs of chromosomes. II. Intersectional hybridization***. Can. J. Genet. Cytol. 12:90-99, (1970).

[19] Sehgal, D. And Raina, S.N., **Carthamus. In Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources,** Oil Crops. Ed: Chittaranjan Kole, Springer, New York, NY. 322 p., (2011).

[20] Knowles, P.F., ***Safflower in Hybridization of Crop Plants***, Ed. Walter R. Fehr and Henry H. Hadley. American Society of Agronomy and American Society of Soil Association. Madison, Wisconsin USA,p. 535-548, (1980).

[21] Claassen, C.E., ***Natural and controlled crossing in safflower***, *Carthamus tinctorius* L. *Agron. J.* 42: 301–304, (1950).

[22] Conrad, L.S., Eubanks, L.P., and Middlecamp, C.H.,***Chemistry in Context,*** McGraw Hill Higher Education, 3rd Ed. Boston, USA, (2000).

[23] Bailey, P.S. Jr., and Bailey, C. A.,***Organic Chemistry. A Brief Survey of Concepts and Applications,*** 6th Edition. *J.* Chem. Educ., 78 *(7)*,p. 881, (2001).

[24] Hill, J.W., and Kolb, D.K., ***Chemistry for Changing Times,***9th Ed. Upper Saddle River, NJ. Prentice-Hall Pub., (2001).

[25] Nas, S., Gökalp, Y.H., ve Ünsal, M., ***Bitkisel Yağ Teknolojisi***, Pamukkale Üniversitesi, Mimarlık Fakültesi Matbaası, s.322,(2001).

[26] Young, J.A., ***Chemical Laboratory Information Profile: Oleic Acid,*** Journal of Chemical Education Vol 79 issue 1 p. 24,(2002).

[27] Özdemir, N. ve Denkbaş, E. B.,***Hayat veren yağlar: Omega yağları***, Bilim ve Teknik Dergisi, 427: 78-80, (2003).

[28] Sarguis, J.L.,***Fats and Fatty Acids***, Chemistry: Foundations and Applications, Macmillan Reference USA, p.6, (2004).

[29] Win, T.D.,***Oleic Acid – The Anti-Breast Cancer Component in Olive Oil***, AU J.T. 9(2): 75-78.,(2005).

[30] Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., and Parmentier, M., ***Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential***, European Journal of Lipid Science and Technology, 109: 710–732., (2007).

[31] Taylor, M. A., Smith, S. B., Davies, H. V., and Burch, L. R., ***The primary structure of a cDNA clone of the stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from potato (Solanum tuberosum L.),*** Plant Physiol. 100:533-534, (1992).

[32] Akagi, H., Baba, T., Shimada, H., and Fujimura, T., ***Nucleotide sequence of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase cDNA from developing seeds of rice***, Plant Physiol. 108:845-846, (1995).

[33] Shanklin, J., and Somerville, C., ***Stearoyl-acyl-carrier-protein protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs***, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:2510-2514,(1991).

[34] Thompson, G. A., Scherer, D. E., Foxall-Van, A. S., Kenny, J. W., Young, H. L., Shintani, D. K., Kridl, J. C., and Knauf, V. C., ***Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity***, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:2578-2582, (1991).

[35] Kaçar, Y.A., ***Lipid Metabolizması.*** Ç.Ü. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Bitki Biyokimyası Ders Notları, 36 sunu. (2010).
www.bahcebitkileri.org/Sunumlar/10.lipid_biyosentezi.pps

[36] Hamdan, Y.A.S., Garcia-Moreno, M.J., Ferna´ndez-Mart´ınez, J.M., Velasco, L., and Perez-Vich, B.,***Mapping of major and modifying genes for high oleic acid content in safflower,*** Molecular Breeding, 30:1279–1293, (2012)
DOI 10.1007/s11032-012-9714-y

[37] Fernandez-Martı´nez, J.M., Rio, M., Haro, A., ***Survey ofsafflower (Carthamus tinctorius L.) germplasm for variants in fatty acid composition and other seed character,***
Euphytica 69:115–122, (1993)
[38] Hamdan, Y.A.S., Perez-Vich, B.,Velasco, L., Ferna´ndez-Martı´nez, J.M., ***Inheritance of high oleic acid content in safflower,*** Euphytica 168:61–69, (2009)
[39] Guan, L-L., Xu, Y-W., Wang, Y-B., Chen, L, Shao, J-F., Wu, W.,***Isolation and characterization of a temperature regulated microsomal oleate desaturase gene (CtFAD2-1) from safflower (Carthamus tinctorius L.)***, Plant Mol. Biol,(2011) Rep. doi:10.1007/s11105-011-0349-7
[40] Hamdan, Y.A.S.,Velasco, L., Perez-Vich, B., ***Development of SCAR markers linked to male sterility and very high linoleic acid content in safflower,*** Mol Breeding 22:385–393, (2008)
DOI 10.1007/s11032-008-9183-5
[41] Fernandez-Martinez, J., Munoz, J., Jimenez-Ramirez, A., Dominguez-Jimenez, J., and Alcantara, A.,***Temperature effect on the oleic and linoleic acid of three genotypes in sunflower.*** Grasas Aceites, 37 : 327-333, (1986).
[42] Vrânceanu, A.V., Soare, G., and Craiciu, D.S., ***Breeding sunflower for high oleic acid content,*** Analele ICCPT – Fundulea, vol. LXII: 97-96, (1995).
[43] Lajara, J.R., Diaz, U., and Quidiello, R.D., ***Definite influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil***, J. Am. Oil Chem. Soc., vol. 67, pp. 618-623, (1990).
[44] Samancı, B., and Özkaynak, E., ***Effect of planting date on seed yield, oil content and fatty acid composition of safflower (Carthamus tinctorius L.) cultivars grown in the Mediterranen region of Turkey***, J. Agronomy& Crop Science, (189): 359-360,(2003).
[45] Qadir, G., Shahbaz, A., Hassan, U.F., and Cheema, A.M., ***Oil and Fatty Acid Accumulation in Sunflower as Influenced by Temperature Variation,***Pak. J. Bot., 38(4): 1137-1147, (2006).
[46] Garces, R., Sarmiento, C., and Mancha, M., ***Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (Helianthus annuus L.) seed,***Planta, vol. 186, pp. 461-465, (1992).

[47] Demurin, Y., Skoric, D., Veresbaranji, I., and Jocic, S., ***Inheritance of increased oleic acid content in sunflower seed oil,*** *HELIA*, 23: 87-92,(2000).

[48] Nagaraj, G., and Reddy, P.S., ***Some factors influencing safflower seed and oil quality***, 4th International Safflower Conference, 347-349, June,2-7, Bari, Italy, (1997).

[49] Pritchard, F. M., Eagles, H.A., Norton, R. M., Salisbury, P. A., and Nicolas, M., ***Environmental effects on seed composition of Victorian canola***, Australian Journal of Experimental Agriculture, 40(5): 679-685, (2006).

[50] Harris, H. C., McWilliam, J. R., and Mason, W. K., ***Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed,*** Australin Journal Of Agricultural Research, 29(6): 1203-1212,(2006)**.**

[51] Bellaloui, N., Mengistu, A., and Kassem, M.A., ***Effects of Genetics and Environment on Fatty Acid Stability in Soybean Seed,*** Food and Nutrition Sciences, (4): 165-175,(2013).

[52] Sukkasem, C., Laosuwan, P., Wonprasaid, S., and Machikowa, T., ***Effects of Environmental Conditions on Oleic Acid of Sunflower Seeds***, International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS) Vol: 1, Issue 2 p.395-396,(2013).

[53] Naveed, A., Cowling W., Bayliss, K., Nelson, M., and Kailis, S**.,** ***Influence of genotype and environment on fatty acid composition in canola (Brassica napus),***(2006).http://www.grdc.com.au/growers/res_upd/west/w04/naveed.htm - 18k

[54] Aslam, M.N., Nelson, M.N., Kailis, S.G., Bayliss, K.L., Speijers, J. and Cowling, W.A**.,** ***Canola oil increases in polyunsaturated fatty acids and decreases in oleic acid in drought-stressed Mediterranean-type environments,*** Plant Breeding, 128 (4). pp. 348-355,(2009).

[55] Bellaloui, N.,***Effect of Water Stress and Foliar Boron Application on Seed Protein, Oil, Fatty Acids, and Nitrogen Metabolism in Soybean***, American Journal of Plant Sciences, Vol. 2 No. 5, pp. 692-701,(2011).

[56] Izquierdo, N.G., Aguirrezabal, A.N., Andrade, F., and Pereyra, V.,***Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phonological stage***,Field Crop. Res., vol. 77, pp. 115-126,(2002).

[57] Martínez, D.R., Izquierdo, G.N., Belo,G.R., Aguirrezábal, A.N.L., Andrade, F., and Reid, R.,***Oil yield components and oil quality of high stearic-high oleic***

sunflower genotypes as affected by intercepted solar radiation during grain filling,Crop and Pasture Science 63(4): 330-337,(2012).

[58] Ahmad, R., Saeed, M., Ullah, E., and Mahmood, T.,***Effect of potassium on protein, oil and fatty acid contents in two autumn planted sunflower hybrids***,Int. J. Agri. Biol., Vol. 1, no. 4, pp. 325-327,(1999).

[59] Boydak, E.,Karaaslan, D., and Turkoglu, H., ***The effect of different nitrogen and irrigation levels on fatty acid composition of peanut oils,***Turk. J. Field Crops, vol. 15, no. 1, pp. 29-33,(2010).

[60] Ahmad, A., Abdin, Z. M., ***Effect of sulphur application on lipid, RNA and fatty acid content in developing seeds of rapeseed (Brassica campestris L.),*** Plant Science, 150: 71-76,(2000).

[61] Nicolosi, R.J., Stucchi, A.F., and Loscalzo, J., ***Effect of dietary fatsaturation on low-density lipoprotein metabolism***, In: Nelson G. J. (Ed). Health Effects of Dietary Fatty Acids, p. 77-82. AOCS Press Champaign Illinois,(1991).

[62] Pérez-Jiménez, F., Lopez-Miranda, J., and Mata, P., ***Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. Atherosclerosis***, 163(2): 385-398,(2002).

[63] Anonim, 2014. Hiperlipidemi (Kolesterol Yüksekliği). http://hastane.akdeniz.edu.tr/hiperlipidemi-kolesterol-yuksekligi-

[64] Anonim, 2014. Lorenzo's Oil http://www.myelin.org/lorenzosoil/lorenzosoiltheoil.html

[65] Aubourg, P., Adamsbaum, C., Lavallard-Rousseau, M.C., Rocchiccioli, F., Cartier, N., Jambaque, I., Jakobezak, C., Lamaitre, A., Boureau, F., and Wolf, C.***, A two-year trial of oleic acid and erucic acids ("Lorenzo's Oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy (ALD),***New England Journal of Medicine329:745-752, (1993).

[66] Warner, K.,Neff, W.E., Byrdwell, W.C., and Gardner, H.W.,***Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and trilinolein***,J Agric Food Chem.49(2): 899-905,(2001).

[67] Warner, K., Orr, P.,and Glynn, M., ***Effects of fatty acid composition of oils on flavor and stability of fried foods***, J. Am. Oil Chem. Soc. *74:* 347–356,(1997).

[68] Gamel, T.H.,Kiritsakis, A., and Petrakis, C.,***Effect of phenolic extracts on trans***

fatty acid formation during frying,Grasas y Aceites Vol. 50(6): 421-425,(1999).

[69] Aladedunye, F., and Przybylski, R., ***Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content***, Food Chemistry, 141 (3): 2373–2378,(2013).

[70] Davidson, W.S., Saxena, R. K., and Gupta, R., ***The fungistatic action of oleic acid***, In The Microbiological Safety of Processed Foods eds. Crowther, J. S. and Marthi, B. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, p. 128,(1999).

[71] Alvarez, A.M.R., and Rodríguez, M.L.G.,***Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations,***Grasas y Aceites Vol. 51. Fasc. 1-2 : 74-96, (2000).

[72] Anonim, ***Oleic Acid. Oil and Plants***.http://www.oilsandplants.com/oleicacid.htm (2014).

[73] Röbbelen, G., Downey, R. K., Ashri, A.,***Oilcrops of the world***. McGraw Hill Books, USA,(1989).

[74] Samancı, B., Özkaynak, E., Başalma, D., ÖZdemir, F., ve Topuz, A., ***Bazı Aspir (Carthamus tinctorius L.) Çeşitlerinde Farklı Ekim Zamanlarının Yağ Asidi Oranlarına Etkisi***, Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi, 15- 18 Kasım, Adana, Cilt 2, 363-367, (1999).

[75] Armah-agyeman, G., Loiland, J., Karow, R., Hang,A.N., ***Safflower,*** Oregon State University EM 8792, Published in July,(2002).

[76] Aşkın, Y., ***Aspir (Carthamus persicus Wild) Yağ Asidi Bileşiminin İncelenmesi***. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, (2008).

[77] Melchınger A.E., ***Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance***, Plant Breed. 104: 1–19., (1990).

[78] Hvarleva, Tz., I. Tarpomanova, M. Hristova-Cherbadji, M. Hristov, A. Bakalova, A. Atanassov, I Atanasov.,***Toward Marker Assisted Selection for Fungal Disease Resistance in Sunflower.*** Utilization of *H. bolanderi* as a Source of Resistance to Downy Mildew. Biotechnol. Biotechnol. EQ, 23: 1427–1430, (2009).

[79] Brettıng PK, MP Widrlechner, ***Genetic markers and plant genetic resource management,*** Plant Breeding Reviews, vol: 13, Edited by J Janick. John Wiley & Son Inc. Canada. ,Pp. 11-86, (1995).

[80] Akkurt, M., ***Bahçe Bitkilerinde Moleküler Genetiğin Kullanımı,*** Ankara

Üniversitiesi Ziraat Fakültesi, Moleküler Markör Teknikleri Sunusu, s.30-61,(2016).

[81] Yazdi-Samadi, B., R. Maali-Amiri, M. R. Ghannadha, and C. Abd- Mishani, ***Detection of DNA polymorphism in landrace populations of safflower in Iran using RAPD-PCR technique***, In:J. W. Bergman, and H. H. Mu¨ndel (eds), Proc. 5th Int. SaThower Conf., 163. Williston, ND and Sidney, MO, USA, 23–27 July,(2001).

[82] Sehgal, D., and S. N. Raina, ***Genotyping safflower (Carthamus tinctorius) cultivars by DNA fingerprints***, Euphytica 146, 67—76,(2005)

[83] Johnson, R. C., T. J. Kisha, and M. A. Evans,***Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers***, Crop Sci. 47, 1728—1736, (2007).

[84] To´th, G., Z. Ga´spari, and J. Jurka, ***Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis***, Genome Res. 10, 967—981,(2000).

[85] Philips, R. L., and I. K. Vasil, ***DNA-Based Markers in Plants***, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,(2001).

[86] Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello,***Strategies for microsatellite isolation: a review***, Mol. Ecol. 11, 1—16, (2002).

[87] Chapman, M. A., J. Hvala, J. Strever, M. Matvienko, A. Kozik, R. W. Michelmore, S. Tang, S. J. Knapp, and J. M. Burke, ***Development, polymorphism, and cross-taxon utility of EST-SSR markers from safflower (Carthamus tinctorius L.),*** Theor. Appl. Genet. 120, 85—91, (2009).

[88] Chapman, M. A., J. Hvala, J. Strever, and J. M. Burke, ***Population genetic analysis of safflower (Carthamus tinctorius L.; Asteraceae) reveals a Near-Eastern origin and five centers of diversity***. Am. J. Bot. 97, 831—840, (2010).

[89] Naresh, V., K. N. Yamini, P. Rajendrakumar, and V. Dinesh Kumar, ***EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids,*** Euphytica 170, 347—353, (2009).

[90] Mayerhofer, R., C. Archibald, V. Bowles, and A. G. Good, ***Development of molecular markers and linkage maps for the Carthamus species C. tinctorius and C. oxyacanthus,*** Genome 53, 266—276, (2010).

[91] Bowles, V. G., R. Mayerhofer, C. Davis, A. G. Good, and J. C. Hall, ***A phylogenetic investigation of Carthamus combining sequence and microsatellite data,*** Plant Syst. Evol. 287, 85—97,(2010).

[92] Hamdan, Y.A.S., Garcia-Moreno, M.J., Redondo-Nevado, J., Velasco, L., and

Perez-Vich, B., ***Development and characterization of grnomic microsatellite markers in safflower (Carthamus tinctorius L.),*** Plant Breeding 130, p.237-241, (2011).

[93] Mensink RP, Katan MB, ***Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men***. N Engl J Med 321:436–441, (1989)

[94] Corbett, P.,***Research in the area of high oleic oils***, Bulletin IBP, Number 1, Institut de Biotechnologie des Plantes, CNR-NRC, Canada, (2002) .

[95] Ferna´ndez-Mart´ınez JM, Pe´rez-Vich B, Velasco L, Dom´ınguez J., ***Breeding for specialty oil types in sunflower***, Helia 46:75–84, (2007).

[96] Knowles P.F.,***Safflower,*** In: Downey RK, Ro¨bbelen G, Ashri A (eds) Oil crops of the world. McGraw-Hill, New York, pp 363–374, (1989)

[97] Horowitz B, Winter W.,***A new safflower oil with low iodine value***, Nature 179:582–583, (1957). doi:10.1038/179582a0

[98] Knowles, P.F., Mutwakil, A**.,** ***Inheritance of low iodine value of safflower selections from India,*** Econ Bot 17: 139–145, (1963).

[99] Bergman J.W., Riveland N.R., Flynn C.R., Carlson G.R., Wichman D.M., Kephart, K.D.,***Registration of 'Montola 2004' safflower***, Crop Sci 46:1818–1819, (2006) doi:10.2135/cropsci2005.12-0494

[100] Knowles, P.F., Hill, A.B., ***Inheritance of fatty acid content in the seed oil of a safflower introduction from Iran***. Crop Sci 4:406–409, (1964)

[101] Knowles, P.F.,***The plant geneticist's contribution towards changing lipid and amino acid composition of safflower***, J Am Oil Chem Soc 49:27–29, (1972) doi:10.1007/BF02545133

[102] Briggs, F.D., Knowles, P.F.,***Introduction to plant breeding***, Reinhold Publishing Corporation, New York, (1967).

[103] Ferna´ndez-Mart´ınez, J.M., Jime´nez, A., Dom´ınguez J, Garc´ıa, J.M., Garce´s, R., Mancha, M., ***Genetic analysis of the high oleic content in cultivated sunflower* (*Helianthus annuus* L.)**, Euphytica 41:39–51, (1989). doi:10.1007/BF00022409

[104] Volmann, J., and Rajcan, I., ***Handbook of Plant Breeding***, Oil Crops, (2009).

[105] S.Kahya, E.Büyükcangaz, K.T. Carlı, ***Polimereaz Zincir Reaksiyonu(PCR)***

Optimizasyonu, Uludağ Univ. J.Fac. Vet. Med. 32 1 : 31-38, (2013)

[106] Singh, V., Nimbkar, N., ***Safflower,*** In: Singh RJ (ed) Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement : oilseed crops, vol 4. CRC Press, Boca Raton, pp 167–194, (2007)

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Tekirdağ'da doğdum. İlkokulu Şarköy/Tekirdağ'da, ortaokul ve lise eğitimimi İstanbul'da tamamladıktan sonra 2004 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde lisans eğitimimi tamamladım. 2012 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Kalite Yönetimi Anabilim Dalı Toplam Kalite Yönetimi-Tezli yüksek lisans derecesinden mezun oldum. Tarım Bakanlığı'na bağlı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde 2012 yılından beri ziraat yüksek mühendisi olarak çalışmaktayım.